

Patkányok ultrahangos vokalizációján alapuló
viselkedésfarmakológiai állatmodellek alkalmazhatósága, korlátai
és a modellekben rejlő további lehetőségek

Kassai Ferenc

Eötvös Loránd Tudományegyetem



Biológia Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Erdei Anna egyetemi tanár, D.Sc.

Ideg tudomány és Humánbiológia Doktori Program

Vezetője: Dr. Détári László egyetemi tanár, D.Sc.

Témavezető:

Dr. Bárdos György, Egyetemi tanár és intézet vezető, az MTA
doktora

Konzulens:

Dr. Gyertyán István, Laborvezető, PhD.



Richter Gedeon Nyrt.
Viselkedésfarmakológiai laboratórium

2013

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	5
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. A patkányok ultrahangos vokalizációja.....	8
2.1.1. Az 50 kHz-es vokalizációk.....	8
2.1.2. A 22-24 kHz-es vokalizációk	9
2.1.3. A 35-40 kHz-es vokalizációk	11
2.2. A patkányok ultrahangos vokalizációján alapuló viselkedésfarmakológiai állatmodellek	12
2.2.1. Szorongás és pánik modellek	12
2.2.2. Felnőtt patkányok 22-24 kHz-es vokalizációján alapuló fájdalom modellek	20
3. Célkitűzések	22
3.1. Szorongásoldó anyagok gyógyszerfejlesztése során szűrésre alkalmas USV módszerek beállítása, összehasonlítása és alkalmazása	22
3.1.1. A megfelelő sokkolási intenzitás, patkánytörzs és állat beszállító kiválasztása a módszerek beállításához	22
3.1.2. A tesztprotokollok összehasonlítása.....	23
3.1.3. A többszöri sokkolásos modell szűrőmodszereként történő alkalmazása.....	24
3.2. Az MTEP és rimonabant együttes hatásának vizsgálata	25
3.2.1. Felnőtt patkányok USV-jének fokozásán alapuló anxiogenitás modell beállítása..	26
3.2.2. Memóriarontó és -javító anyagok hatásának vizsgálata a sokkolási környezethez társított USV akvizíciójára	27
3.2.3. Az MTEP és a rimonabant együttes hatásának vizsgálata a szorongásra és a memóriára.....	28
3.3. 22-24 kHz-es ultrahanggal kiváltott dermedési reakció vizsgálata	28
4. Anyag és módszer	30
4.1. Az állatok.....	30
4.2. Eszközök.....	30
4.2.1. Sokkoló kamrák és az USV detektáló és feldolgozó rendszer	30
4.2.2. USV felvevő-lejátszó rendszer és az ultrahang kiváltotta viselkedési válaszok vizsgálata	31
4.3. Kísérleti elrendezések.....	32

4.3.1. Az egyszeri sokkolásos elrendezés.....	32
4.3.2. A többszöri sokkolásos elrendezés	33
4.3.3. A sokkolási környezethez társításos elrendezés	33
4.3.4 22-24 kHz-es ultrahanggal kiváltott dermedés vizsgálata során alkalmazott kísérleti elrendezések.....	34
4.4 Tesztelt vegyületek adagolása és oldása.....	34
4.5 Statisztika.....	35
5. Az eredmények bemutatása és megvitatása	36
5.1. Az egyszeri és többszöri sokkolásos, valamint a sokkolási környezethez társításos USV modellek beállítása, összehasonlítása és alkalmazása.....	36
5.1.1. A megfelelő sokkolási erősség kiválasztása a három modellhez	36
5.1.2 A különböző patkánytörzsek és beszállítók összehasonlítása az egyszeri sokkolásos USV paradigmában	37
5.1.2. Az egyszeri- és a többszöri sokkolásos, valamint a sokkolási környezethez társításos paradigmák összehasonlítása	39
5.1.3. A többszöri sokkolásos modell szűrőmodszereként történő alkalmazása.....	51
5.2. Az MTEP és rimonabant együttes hatása	56
5.2.1. A CB ₁ , GABA _A és GABA _B receptor antagonisták USV fokozó hatása	56
5.2.2. A beállított modell alkalmassága szorongáskeltő mellékhatással rendelkező vegyületek szűrésére.....	57
5.2.3 A MK-801, MTEP és a rimonabant hatása a félelmi memória akvizíciójára a sokkolási környezethez társításos USV protokollban	58
5.2.4. A sokkolási környezethez társításos USV paradigma, mint memória modell	59
5.2.5. A MTEP és a rimonabant együttes hatása az egyszeri sokkolásos és az anxiogenitás modellben, valamint a sokkolási környezethez társított USV modell akvizíciós paradigmájában	60
5.2.6. Kombinált mGlu ₅ és CB ₁ receptor antagonistá hatással rendelkező vegyületek elhízás elleni szerként történő fejleszthetősége	62
5.6. Mesterséges és természetes ultrahangokkal kiváltott dermedési reakció vizsgálata.....	63
5.6.1. A szakaszos lejátszás és a frekvencia hatása a dermedés mértékére, valamint a természetes és generált hangok összehasonlítása	63
5.6.2. Az ultrahang lejátszással kiváltott dermedés szorongás modellként történő alkalmazhatósága.....	65
6. Konklúzió	67

7. Összefoglalás	69
8. Summary	71
Irodalomjegyzék	73
Köszönetnyilvánítás.....	87

Rövidítésjegyzék

5-HT – szerotonin

8-OH-DPAT – 8-Hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin

7-OH-DPAT – 7-Hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin

A-843277 – N-(2,6-dimetoxibenzil)-N0[4-(4-fluorofenil)thiazol-2-il]guanidin

AM251 – 1-(2,4-diklorofenil)-5-(4-jodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil)pirazol-3-karboxamid

AP5 – 2-amino-5-foszfopentán sav

CB – kannabinoid

CDP – klórdiazepoxid

CP 55940 – 2-[(1R,2R,5R)-5-hidroxi-2-(3-hidroxipropil) ciklohexil]-5-(2-metiloktán-2-il)fenol

CPP – 3-((±)-2-karboxipiperazin-4-il)-propil-1-foszfopentán sav

DOI – 2,5-dimetoxi-4-jodoamfetamin

FG7142 – N-metil-9H-pirido[5,4-b]indol-3-karboxamid

GABA – γ -amino-vajsav

IL-639 – (8aS,12aR)-2-(2,6-Difluorofenil)-5,6,7,8,8a,9,10,11,12,12a-dekahidro-pirido[3',4':4,5]pirrolo[1,2,3-ef][1,5]benzotiazepin

i.p. – intraperitoneális

mCPP – 1-(3-klorofenil)piperazin

mGlu – metabotróp glutamát

MK-801 – (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cikloheptén-5,10-imin

MPEP – 2-metil-6-(feniletinil)-piridin

MTEP – 3-[(2-metil-1,3-thiazol-4-il)etinil]piridin

NAM – negatív allosterikus modulátor

NMDA – N-metil-D-aszpartát

PAG – periaqueductális szürke állomány

PCP – fenciklidin

PTZ – pentiléntetrazol

Ro64-6198 – 8-[(1S,3aS)-2,3,3a,4,5,6-hexahidro-1H-fenalen-1-il]-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]dekán-4-on

S32006 – N-piridin-3-il-1,2-dihidro-3H-benzo [e]indol-3-karboxamid

SB-242084 – 6-kloro-5-metil-N-[6-(2-metilpiridin-3-iloxi)piridin-3-il]indolin-1-karboxamid

SB-699551-A – N-[2-(dimetilamino)etil]-N-[[40-[(2-feniletil)amino]metil][1,10-bifenil]-4-il]metil]ciklopentánpropanamid dihidroklorid

s.c. – subcután

SCH50911 – (+)-2-(5,5-dimetilmorfolin-2-il)ecetsav hidroklorid

SEM – az átlag standard hibája

SSRI – szelektív szerotonin visszavétel gátló

USV – ultrahangos vokalizáció

WIN55212-2 – (R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil- 3-(4-morfolinilmetil) pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanon

1. Bevezetés

A patkányok –hasonlóan más kisemlősökhöz– ultrahang tartományba eső hangjelzésekkel is kommunikálnak. A patkányok ultrahangos vokalizációját számos szemszögből megvizsgálták, és a kiadott hangok természetéről, jelentéstartalmáról nagy mennyiségű információ halmozódott fel.

Ennek hatására elindultak az ultrahangos vokalizáció farmakológiai állatkísérletekben történő felhasználására irányuló törekvések is, aminek eredményeképpen több új viselkedési teszt született, melyek elsősorban szorongásos betegségeket modelleznek.

A viselkedésfarmakológiai állatmodellek alapvető célja, hogy előre jelezzék a tesztelt vegyületek majdani humán hatékonyságának mértékét. A modellek transzlációs értékének ismerete és fokozása elengedhetetlen a sikeres gyógyszerfejlesztéshez. Napjainkban ez a kérdés neuralgikus pontja a gyógyszerkutatásnak.

Dolgozatomban az ultrahangos vokalizáción alapuló modellek gyógyszerfejlesztésben történő alkalmazhatóságának bizonyos aspektusait elemzem. A már korábban az irodalomban leírt modellek mellett kitérek új, eddig nem használt modellbeállítási lehetőségekre is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A patkányok ultrahangos vokalizációja

A patkányoknak három, különböző frekvencia tartományba eső ultrahangos vokalizációja (USV) ismert. Felnőtt patkányok két frekvencián, 50 és 22 kHz körül adnak ki ultrahangot, míg az újszülött patkányok 35-40 kHz-en vokalizálnak. Az USV-nek alapvető szerepe van az egyedek közötti kommunikációban. Egyrészt az állatok ezzel hozhatják a fajtársak tudomására belső hangulat állapotukat, másrészt így hívhatják fel a figyelmet a környezetükben bekövetkező változásokra (pl. predátor megjelenése). A vokalizációkkal közvetített jelentéstartalom függ egyrészt a vokalizáció frekvenciájától, valamint a kontextustól, amelyben azok elhangzanak.

2.1.1. Az 50 kHz-es vokalizációk

Egyes kutatók szerint az 50 kHz-es kb. 20 ms-ig tartó vokalizációk az örömrzét kifejezésére szolgálnak (Panksepp és Burgdorf, 2000; Panksepp és Burgdorf, 2003; Panksepp, 2007), sőt olyan hipotézis is született az 50kHz-es USV-vel kapcsolatban, miszerint ez tulajdonképpen az örömrzét kifejezésének egy olyan evolúciósan kezdetleges formája, ami emberben megfeleltethető a gyermekek játék közben hallatott kacajának (Panksepp és Burgdorf, 2003). Az 50 kHz-es vokalizációkat valóban leggyakrabban pozitív ingerek váltják ki, de nem kizárólag a kellemes érzét kifejezésére szolgálnak.

Az 50 kHz-es USV váltható ki felnőtt patkányokból csiklandozással, illetve az állatok kézzel történő játékos simogatásával, lökdösésével (Panksepp és Burgdorf, 2003; Schwarting és mtsai, 2007; Wöhr és mtsai, 2009).

Az 50 kHz-es vokalizációkat az állatok kiadhatják egy elvárt kellemes inger bekövetkezését megelőzően is, úgymint játék (Knutson és mtsai, 1998), táplálék felvétel (Burgdorf és mtsai, 2000) vagy párzás előtt (Barfield és mtsai, 1979; McGinnis és Vakulenko, 2003). Ehhez hasonlóan anticipátoros vokalizációk mérhetők olyan társított inger hatására is, amely előre jelzi az állatnak egy örömrzétet keltő drog, kokain (Mu és mtsai, 2009), karbakol (Fendt és mtsai, 2006) vagy amfetamin és morfin (Knutson és mtsai, 1999) adagolását, vagy kellemes érzétet keltő agyi elektromos stimuláció bekövetkeztét (Burgdorf és mtsai, 2000; Burgdorf és mtsai, 2007). Az anticipátoros vokalizációk tehát a kellemes inger iránti vágyakozást fejezhetik ki.

A vokalizációk abban az esetben is megfigyelhetők, amikor az állatokat szeparálják a többi állattól (Wöhr és Schwarting, 2007; Wöhr és mtsai, 2008). A szeparációt követően mind a ketrecből kivett, mind az eredeti dobozban egyedül maradó állatok egyből elkezdenek vokalizálni (Wöhr és Schwarting, 2007). Feltehetően ezeknek a vokalizációknak a funkciója a kommunikáció újra felvétele lehet (Wöhr és Schwarting, 2007). Ezt erősíti meg az a megfigyelés, miszerint az 50 kHz-es USV visszajátszása fokozza az állatok aktivitását, valamint a hangnak kitett állatok hajlamosak a hangforrás irányába mozogni, illetve annak közelében tartózkodni (Wöhr és Schwarting, 2007; Sadananda és mtsai, 2008).

Rezidens-behatoló kísérletek során is megfigyelhetők 50 kHz-s vokalizációk. Ezekeben a kísérletekben egy nagyobb testtömegű, erősebb állat (rezidens) ketrecébe egy fiatalabb, kisebb állatot tesznek be (behatoló). Ilyenkor a rezidens állat megtámadja a behatolót. A rezidens-behatoló interakciók során a behatoló (22 kHz-es vokalizációk mellett) 50 kHz-es vokalizációkat is hallat (Takahashi és mtsai, 1983; Thomas és mtsai, 1983). A rezidens agresszív viselkedésének hatására kiadott 50 kHz-es hangok nagy része nem frekvencia modulált, szemben a játék során kiadott vokalizációkkal, melyek frekvenciája nem állandó, hanem egy kb. ± 20 kHz-es sáv szélességben változik (Burgdorf és mtsai, 2008). Ebben a tesztelrendezésben a morfin csökkentette az 50 kHz-es vokalizációk számát, vélhetőleg azért, mert a morfin fájdalomcsökkentő hatása miatt a behatolók kevésbé reagáltak a rezidens agresszív viselkedésére (Vivian és Miczek, 1993). A rezidens-behatoló tesztek során hallatott 50 kHz-es vokalizációk pontos funkciója nem tisztázott.

Tehát, az 50 kHz-es vokalizációk nem csak az örömrzést fejezhetik ki, hanem szerepük lehet a fajtársakkal történő kapcsolatfelvételben is.

2.1.2. A 22-24 kHz-es vokalizációk

Szemben az 50 kHz-es USV-vel, a 22-24 kHz-es, kb. 300-600 ms hosszú vokalizációk elsősorban negatív ingerekkel válthatók ki. Ezeket a hangokat igen változatos szituációkban adják ki az állatok, ennek megfelelően jelentés tartalmuk is többféle.

Egyrészt vészjelző szerepük van, a patkányok ezzel jelzik a predátor jelenlétét a fajtársaknak (Litvin és mtsai, 2007). Ezt igazolják azok a vizsgálatok, ahol a patkányok viselkedését természetes környezetüket imitáló, úgynevezett „visible burrow system”-ben vizsgálták. A visible burrow system két részből áll, egy nyílt felszíni felületről, ahol az állatok számára a táplálékot és az ivóvizet biztosítják, illetve egy zárt, felszín alatti részből,

ahol kiépített alagutak találhatók. Az alagutakban a világítás vörös fénnel van megoldva. Ezeket a járatokat az állatok búvóhelyül használják, nappal itt alszanak. Ha macskát raktak be a nyílt felületre, a patkányok bemenekültek a járatokba, és elkezdtek vokalizálni (Blanchard és mtsai, 1991). Amennyiben a patkányokat a fajtársaktól izoláltan nevelték fel, kevesebbet vokalizáltak (Blanchard és mtsai, 1991; Inakatig és mtsai, 2005). Szintén kevesebbet vokalizáltak, ha a predátornak nem közvetlenül voltak kitéve, hanem a macskát egy ketrecben helyezték a felszínre (Blanchard és mtsai, 1991). A vészjelzéseket relatíve biztonságos helyről adták, ahol a predátor nem érhetette el őket, valamint a vészjelzéseket csak akkor bocsájtották ki, ha fajtársak is jelen voltak a közelben (Litvin és mtsai, 2007).

A patkányok 22 kHz-es USV-t hallatnak, amikor verekedés közben megadják magukat az erősebb fajtársnak (Takahashi és mtsai, 1983; Litvin és mtsai, 2007). Egyes rezidens-behatoló kísérletekben sikerült kimutatni, hogy a behatoló 22-24 kHz-es vokalizációja csökkenti a rezidens agresszív viselkedését (Lore és mtsai, 1976). Mivel ezt a megfigyelést más vizsgálatokban nem sikerült reprodukálni (Takahashi és mtsai, 1983; Thomas és mtsai, 1983), kérdéses, hogy a rezidens-behatoló kísérletekben a behatoló USV-je valóban a rezidens állatnak szól-e.

A 22 kHz-es USV kiváltható krónikus fájdalommal (Calvino és mtsai, 1996), illetve drogmegvonással (Covington és Miczek, 2003; Kalinichev és Holtzman, 2003) is, tehát nem csak a környezetben bekövetkező változásokat jelezheti, hanem egy negatív belső állapotot is kifejezhet vele az állat.

Hím patkányok 22-24 kHz-es hangokat hallatnak továbbá a párzást követő posztejakulációs stádiumban is. Ez feltehetően megerősíti az elválást a párzás után (Barfield és mtsai, 1979). A párzás után a hypothalamus hőmérséklete megemelkedik. A posztejakulációs vokalizációk mértéke korrelál a hypothalamus hőmérsékletével, így egyes szerzők szerint ezek a vokalizációk tulajdonképpen csak annak a fokozott respirációnak a mellékterméke, ami azt a célt szolgálja, hogy ezt az agyterületet visszahűtse (Blumberg és Alberts, 1991).

Más egyedek 22-24 kHz-es USV-je hatással van a többi állat viselkedésére. Kimutatható, hogy a vokalizációk visszajátszása aktivitás csökkenést okoz (Brudzynski és Chiu, 1995). Egy kísérletben a patkányokat megtanították arra, hogy a sokkoló dobozban a talpsokkot egy hang stimulus jelzi előre. Az így betanított patkányokban a hang stimulus bemutatása szorongást váltott ki az áramütések kiadása nélkül is. A hang hatására az állatok mozdulatlaná dermedtek (freezing), illetve 22-24 kHz-es USV-t adtak ki. Ha a betanított patkány mellé egy olyan állatot tettek be, amely korábban már kapott

áramütéseket, de a hang stimulus jelentését nem ismerte, a betanított állat viselkedésének hatására szintén mozdulatlaná dermedt és vokalizálni kezdett (Kim és mtsai, 2010). Ez a jelenség nem volt megfigyelhető azoknál a patkányoknál, amelyek korábban nem találkoztak az áramütéssel, tehát nem ismerték a veszélyforrást (Kim és mtsai, 2010). Meg kell jegyezni azonban, hogy ebben a kísérletben nem feltétlenül csak a betanított állat USV-je volt hatással a másik állat viselkedésére, hiszen a két állatot ugyanazon sokkoló dobozba helyezték be, így a jelző stimulus jelentését nem ismerő patkány érzékelhette a társa mozdulatlaná dermedését, valamint egyéb, a kísérletben nem mért, a stimulus hatására kialakuló magatartását is.

Sajnos kevés olyan tanulmány született, ahol természetes hangot játszottak vissza az állatoknak. Az ilyen típusú kísérletekben javarészt mesterségesen generált ultrahangot használtak. Ezeknek a mesterséges hangoknak nagyon erős frekvenciafüggő hatása van. 20-25 kHz-es frekvenciatartományba eső hanggal freezing váltható Wistar patkányokból, magasabb és alacsonyabb frekvenciájú hang nem vált ki dermedési reakciót (Nobre és Brandao, 2004).

Megfigyelték azt is, hogy a Lister Hooded patkányok másképp reagálnak a 22 kHz-es mesterséges ultrahangokra, mint a Wistar patkányok. A Lister Hooded törzsnél az ultrahang rendkívül intenzív lokomotoros aktivitásnövekedést, mozgási kitöréseket (locomotor burst, wild running), illetve görcsöt vált ki, majd a hang megszűnése után mutatnak dermedési reakciót (Neophytou és mtsai, 2000; Nicolas és mtsai, 2007). Ez a viselkedésmintázat azonban nem frekvenciafüggő, megfelelő hangerősség esetén gyakorlatilag bármilyen frekvencia tartományba eső hang kiváltja a mozgási kitöréseket, és a hang erősségétől függ az is, hogy ez milyen arányban fordul át audiogén görcsökbe. Viszont alacsony intenzitású, mozgási kitörést még nem indukáló 22 kHz-es hangokkal ezekből az állatokból is aktivitáscsökkenés váltható ki frekvenciafüggő módon (Commissaris és mtsai, 2000).

2.1.3. A 35-40 kHz-es vokalizációk

Újszülött patkányok 35-40 kHz-es, kb. 100-120 ms hosszú vokalizációja a hang képzésének módját tekintve megfeleltethető a felnőtt patkányok 22-24 kHz-es vokalizálásainak (Blumberg és Alberts, 1991). Ezek a vokalizációk azzal válthatók ki, ha az újszülött patkányokat eltávolítják az alomból (McGregor és mtsai, 1996, Olivier és mtsai, 1998b). A kispatkányok USV-jét több aspektusból is vizsgálták. Ezen kísérletek eredményei arra utalnak, hogy kispatkányok így jelzik az anyának, hogy kikerültek a

fészekből. A vokalizációk intenzitása a születés utáni 7. napig magas, a 14. napon már lecsökken, míg a 21 napos patkányok már nem vokalizálnak ezen a frekvencián (Takahashi, 1992). A 7 napos patkányok még nem látnak, és helyváltoztató mozgásuk még igen fejletlen, így feltétlenül anyai segítségre van szükségük ahhoz, hogy visszakerüljenek az alomba. A hangadást csak akkor hagyják abba, ha visszakerülnek az anyához, és taktilis ingerek alapján meggyőződnek arról, hogy az anya valóban mellettük van (Takahashi, 1992). Az újszülött patkányok termoregulációja még nem tökéletes, ezért ha hideg környezetbe kerülnek az alomból, nagyobb veszélynek vannak kitéve. A vokalizációk intenzitása fokozható a hőmérséklet csökkentésével (Blumberg és Alberts, 1991). A vokalizációk mértéke idegen felnőtt hím jelenlétében alacsonyabb, feltehetően azért, mert a hímek gyakran elpusztítják az idegen alomból származó kispatkányokat, ezért veszélyt jelentenek számukra (Takahashi, 1992). A vokalizációk intenzitása összefügg az anyai gondoskodás mértékével; azok a kispatkányok, akikkel az anyjuk többet foglalkozik (pl. többet nyalogatja őket) többet vokalizálnak (Wöhr és Schwarting, 2008).

2.2. A patkányok ultrahangos vokalizációján alapuló viselkedésfarmakológiai állatmodellek

2.2.1. Szorongás és pánik modellek

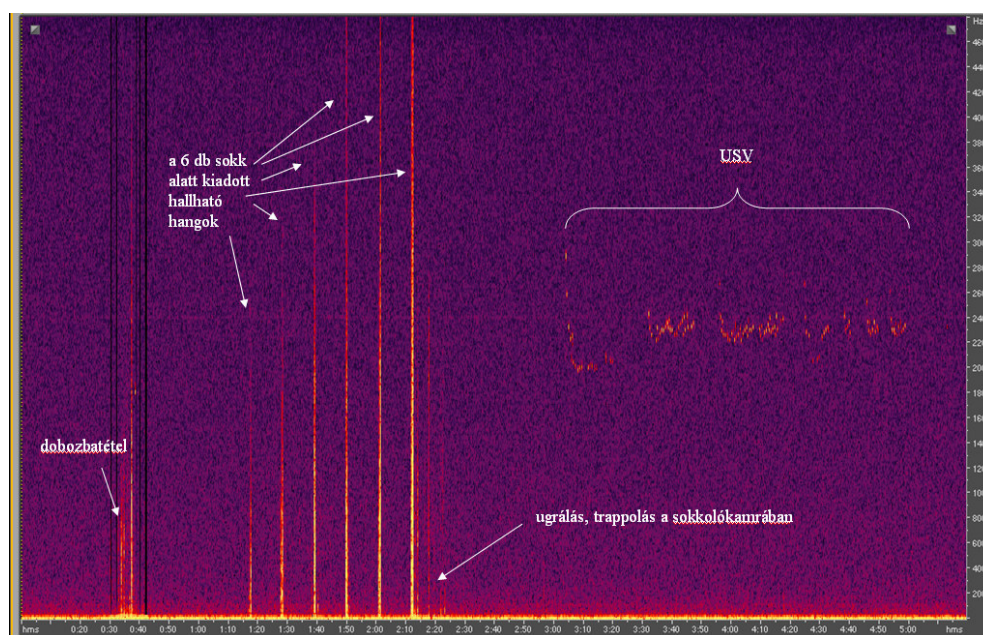
Az irodalomban többféle szorongásmodellt is leírtak, melyek a patkányok ultrahangos vokalizációján alapulnak. A szorongásmodellek mellett egy pánikmodell is létezik, de ezt egyelőre nem használják széles körben, mivel a modell még nincs teljes mértékben validálva.

2.2.1.1. Áramütés kiváltotta 22-24 kHz-es USV gátlásán alapuló szorongás tesztek

Gyakran alkalmazott szorongásmodell a felnőtt patkányok kellemetlen ingerrel kiváltott 22-24 kHz-es vokalizációinak gátlása. A különböző kísérleti elrendezésekben többféle averzív inger is alkalmaznak az USV kiváltására. Az USV kiváltható légfuvattal (Knapp és Pohorecky, 1995; Naito és mtsai, 2003), nagy erősségű hanggal (Maria és mtsai, 1991), agresszív rezidens állattal (Vivian és Miczek, 1993) vagy ragadozóval (Shepherd és mtsai, 1992), illetve az állat ismeretlen környezetbe történő helyezésével (Tomazini és mtsai, 2006). A legpraktikusabb, és ezért szorongás modellekben a leggyakrabban használt eljárás a talp vagy a farok elektromos árammal történő sokkolása. Ennek az eljárásnak az előnye az, hogy a sokkolás intenzitása (az áramütések száma, erőssége és időtartama)

könnyen szabályozható, az áramütésekkel magas és stabil szintű USV váltható ki, valamint a sokkoláshoz szükséges berendezések, bár nem olcsók, de könnyen beszerezhetőek.

Számos tanulmány eredménye azt mutatja, hogy a felnőtt patkányok árammal kiváltott 22-24 kHz-es USV-je az állatok szorongását tükrözi. Az állatok a sokkolás időtartama alatt csak hallható hangokat adnak ki. A hallható hangok kibocsátása egyértelműen az áramütések időtartamára korlátozódik, az USV-k csak a sokkolás után figyelhetők meg (1. ábra). Szemben a sokkolás alatt kiadott hallható hangokkal, az USV csökkenthető a szorongásoldó klórdiazepoxiddal (CDP) (van der Poel és mtsai, 1989). Morfinnal mind a hallható hangadás, mind az USV gátolható (van der Poel és mtsai, 1989). Ez arra utal, hogy a hallható hangokat a fájdalom inger, az USV-t a fájdalom inger hatására kialakult szorongás váltja ki. Nem meglepő, hogy a CDP-hez hasonlóan a morfin is csökkenti az USV intenzitását, hiszen a morfin fájdalomcsillapító hatása miatt az állatok kevésbé reagálnak a kellemetlen ingerre (van der Poel és mtsai, 1989).



1. ábra. Felnőtt Hannover Wistar patkány sokkolása alatt felvett szonogram. A vízszintes tengelyen az idő, a függőleges tengelyen a detektált hangok frekvenciája látható. Jelek világossága arányos a detektált hang erősségével. Az állat dobozba tétel után 40 másodperccel 10 másodperces időközönként 6 db 1 s-ig tartó talpsokkot kapott. A szonogrammon jól látszik, hogy mind a dobozba tétel során keltet zajnak, mind a sokkolás alatt kiadott hallható hangoknak van ultrahangos tartományba eső része. A hallható hangok intenzitása a sokkok számával növekedett. Az USV-t az állat „sorozatokban”(bout) adta ki, a sorozatok frekvenciája akár 46-48 kHz-ről is indulhat.

A megsokkolt patkányok mozdulatlanra dermedés közben adják ki a legtöbb USV-t (Wöhr és mtsai, 2005; Hegoburu és mtsai, 2011). A mozdulatlanra dermedés egy általánosan elfogadott mérője a félelemnek és a szorongásnak. Minthogy az USV nem csak

mozdulatlanná dermedés közben figyelhető meg, illetve mozdulatlanná dermedés közben nem minden esetben adnak ki USV-t az állatok, a freezing és az USV nem teljesen átfedő érzelmi állapotot jelez (Wöhr és mtsai, 2005; Hegoburu és mtsai, 2011).

Egy kísérletben a patkányokat két feltételes ingerre tanították be. Az egyiket a tréningek során a sokkolás időtartama alatt mutatták be az állatoknak, ez volt a veszélyt jelző szignál, a másikat a sokkolás után, ezt volt a biztonságot jelző szignál. A teszteléskor a sokkolási környezetbe visszahelyezett patkányok vokalizálni kezdtek. A veszélyt jelző szignál bemutatásakor a vokalizációk abbamaradtak, majd a biztonságot jelző szignál bemutatásakor újra kezdődtek (Jelen és mtsai, 2003). Ezt a jelenséget a szerzők azzal magyarázták, hogy az USV nem félelmi reakció, hanem a szorongást tükrözi. Ezt erősíti meg az a megfigyelés, miszerint az emelt keresztpallón (elevated plus-maze) a nyílt karba hosszabb időt töltő, tehát kevésbé szorongó állatoknak kevesebb volt az áram kiváltotta USV-jük, mint a nyílt kart nem kedvelő, szorongóbb társaiknak (Borta és mtsai, 2006).

A felnőtt patkányok áramütéssel kiváltott USV-je számos szorongásoldó hatású vegyülettel gátolható (1. táblázat). Közöttük megtalálhatóak a szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI), a γ -amino-vajsav (GABA)_A receptor negatív allosztérikus modulátorai (NAM), a benzodiazepinek, a szerotonin (5-HT)_{1A} agonista hatással rendelkező buspiron, valamint trickilikus antidepresszánsok is, melyeket szorongásos betegségek és depresszió kezelésében alkalmaznak a klinikán. Nem gátolják az USV-t az 5-HT₃ antagonisták (Sanchez, 1993; De Vry és mtsai, 1993; Molewijk és mtsai, 1995; Schreiber és mtsai, 1998; Sanchez, 2003b). Ezek a vegyületek sok más állatmodellben sem mutattak szorongásoldó hatást, továbbá a klinikai vizsgálatok eredményei is ellentmondásosak (Olivier és mtsai, 2000). Az áramütéssel kiváltott patkány USV modellekben szintén nem hatásosak a β_1 és β_2 adrenerg antagonisták (Sanchez, 1993). Ezzel szemben ellentmondásosak az adatok az α_1 és α_2 adrenerg receptorokon keresztül ható vegyületekkel. Bár mind a vegyes α_1 és α_2 adrenerg antagonista hatású fentolaminnal (De Vry és mtsai, 1993), mind a szelektív α_1 antagonista hatású prazosinnal (De Vry és mtsai, 1993), illetve a szelektív α_2 antagonista idazoxánnal (De Vry és mtsai, 1993; Sanchez, 2003b) sikerült USV gátlást előidézni, érdekes módon az α_2 agonista klonidin is csökkentette az USV-t (Sanchez, 2003b). Egyes dopamin receptor agonisták szintén csökkentik az USV-t (1. Táblázat), ezzel szemben a D₂ antagonista haloperidol hatása nem egyértelmű. Számos vizsgálatban nem csökkentette az USV-t (De Vry és mtsai, 1993; Bartoszyk, 1998; Gyertyán és mtsai, 2008; Mead és mtsai, 2008), más kísérletekben viszont hatékonynak bizonyult (Molewijk és mtsai, 1995; Sanchez, 2003b).

1. táblázat. Az irodalomban leírt, felnőtt patkányok USV-jét gátló vegyületek.

Típus	Vegyületnév	Irodalmi hivatkozások
5-HT _{1A} agonista hatású vegyület	8-OH-DPAT	De Vry és mtsai, 1993; Sanchez, 1993; Molewijk és mtsai, 1995; Bartoszyk és mtsai, 1997; Schreiber és mtsai, 1998; Sanchez és Mork, 1999; De Vry és mtsai, 2004;
	Buspiron	De Vry és mtsai, 1993; Sanchez, 1993; Brodtkin és mtsai, 2002
	Gepiron	De Vry és mtsai, 1993; Sanchez, 1993
	Ipsapiron	De Vry és mtsai, 1993; Sanchez, 1993; Molewijk és mtsai, 1995
5-HT _{2A} agonista hatású vegyület	DOI	De Vry és mtsai, 1993; Sanchez, 1993; Schreiber és mtsai, 1998; Sanchez és Mork, 1999
SSRI	Citaloprámm és escitaloprámm	Sanchez és Meier, 1997; Schreiber és mtsai, 1998; Sanchez, 2003a; Sanchez és mtsai, 2003
	Fluoxetin	De Vry és mtsai, 1993; Sanchez és Meier, 1997; Schreiber és mtsai, 1998; De Vry és mtsai, 2004
	Fluvoxamin	Molewijk és mtsai, 1995; Schreiber és mtsai, 1998
	Paroxetin	Sanchez és Meier, 1997; Schreiber és mtsai, 1998
	Szertralin	Sanchez és Meier, 1997
GABA _A receptor NAM (benzodiazepinek)	Alprazolám	Molewijk és mtsai, 1995
	CDP	De Vry és mtsai, 1993
	Diazepám	De Vry és mtsai, 1993; Molewijk és mtsai, 1995; Brodtkin és mtsai, 2002
	Lorazepám	Sanchez és mtsai, 1995
TCA	Klomipramin	De Vry és mtsai, 1993; Molewijk és mtsai, 1995; Sanchez, 2003b
	Imipramin	De Vry és mtsai, 1993; Molewijk és mtsai, 1995; Sanchez, 2003b
mGlu5 receptor NAM	MPEP	Brodtkin és mtsai, 2002
D ₂ receptor agonista hatású vegyület	7-OH-DPAT	Bartoszyk, 1998
	Apomorfin	Bartoszyk, 1998; Sanchez, 2003b
	Kvinpirol	Bartoszyk, 1998; Sanchez, 2003b
NMDA receptor gátló vegyület	MK-801	Sanchez, 2003b
	PCP	De Vry és mtsai, 1993

Az áramütés kiváltotta USV modelleknek többféle kísérleti elrendezése létezik. Az esetek túlnyomó többségében a többször sokkolásos változatot használják. Az 1. táblázatban hivatkozott vizsgálatok két kivétellel (Molewijk és mtsai, 1995, Brodtkin és mtsai, 2002) mind többszöri sokkolásos elrendezésűek voltak. Ebben az elrendezésben az állatokat anyagok tesztelését megelőzően elősokkolásnak teszik ki. Az elősokkolások alkalmával kiszelektálhatóak azok az állatok, amelyekből az áramütések csak kismértékű vokalizációt váltanak ki, valamint a sokkokra jól reagáló állatok USV-je ezzel fokozható. A többször sokkolásos elrendezést többféle protokollal szokták alkalmazni, melyek különböznek az elősokkolások számában, az egyes sokkolások alatt kiadott áramütések számában, erősségében és hosszában. A leggyakrabban használt protokollok a De Vry (De Vry és mtsai, 1993) és Sanchez (Sanchez, 1993) által leírtak. Kifejezetten ritkán, elvértve

alkalmazzák az egyszeri sokkolásos kísérleti elrendezést (pl. Morley és mtsai, 2000). Ebben az elrendezésben nem alkalmaznak elősokkolást, az állatok a teszt napon találkoznak először az áramutésekkel. A felnőtt patkányok USV gátlásán alapuló szorongásmodellnek létezik környezethez (context) és feltételes ingerhez (cue) társított elrendezése. Ezekben az elrendezésekben, az akvizíciós fázis során az áramutéseket a sokkolási környezethez vagy a feltételes ingerhez társítják, így az állatok megtanulják, hogy a sokkoló dobozba történő behelyezésüket követően vagy a feltételes inger (fény vagy hang) bemutatása után áramutéseket fognak kapni. A tréninget követő retenciós fázisban az állatok nem kapnak áramutéseket, ekkor a visszahelyezésük a sokkoló dobozba, vagy a feltételes inger bemutatása váltja ki az USV-t. Az irodalomban leírt, környezethez (Leman és mtsai, 2003; Kosten és mtsai, 2005; Wöhr és mtsai, 2005) vagy feltételes ingerhez (Wöhr és mtsai, 2005; Borta és mtsai, 2006; Kosten és mtsai, 2006) kondicionált USV paradigmák nagy részében nem vegyületeket teszteltek, hanem valamilyen egyéb behatás (pl. izolált tartás) következményét vizsgálták. Az egyes vegyületek társított USV-re gyakorolt hatásáról kevés információ áll rendelkezésre. A sokkolási környezethez társított USV-t gátolták az SSRI-k és az alprazolám (Molewijk és mtsai, 1995) (1. táblázat), míg a kannabinoid (CB)₁ antagonistá rimonabant basolaterális amygdalába történő adagolása fokozta (Roche és mtsai, 2007). Érdekes módon a CB₁ agonista 2-[(1R,2R,5R)-5-hidroxi-2-(3-hidroxipropil) ciclohexil]-5-(2-metiloktán-2-il)fenol (CP55940) szisztémás adagolása szintén fokozó hatású volt (Roche és mtsai, 2007). N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor antagonistá adagolása a basolaterális amygdalába szintén csökkentette az USV-t mind a környezethez, mind a feltételes ingerhez társított elrendezésben (Lee és mtsai, 2001). Ez utóbbi elrendezésben fokozta a vokalizációt a GABA_A receptor gátló pentiléntetrazol (PTZ), míg a szintén GABA_A gátló N-metil-9H-pirido[5,4-b]indol-3-karboxamid (FG7142) hatástalannak bizonyult (Jelen és mtsai, 2003).

2.2.1.2. Az újszülött patkányok USV-jén alapuló szorongásmodell

Ebben a modellben az újszülött patkányokat eltávolítják az alomból, és egy mérő felületre helyezik őket. A szeparáció USV-t vált ki az állatokból. A szeparáció indukálta USV a mérőfelület hűtésével fokozható, ezért sok esetben két hőmérsékleten is elvégzik az anyagok tesztelését, az alomhőmérsékletnek megfelelő kb. 37 °C-on és egy alacsonyabb kb. 20 °C-os hőmérsékleten is (Olivier és mtsai, 1998b). A szeparáció indukálta USV-t számos szorongásoldó vegyülettel csökkenteni lehet (2. táblázat). Ezek között

megtalálhatóak a klinikán hangulatbetegségek kezelésére használt vegyületek is, úgy, mint az SSRI-k, a benzodiazepinek és a buspiron. Érdekes módon a triciklikus antidepresszánsokkal végzett vizsgálatok eredményei vegyes képet mutatnak. A klomipramin csökkentette a vokalizációt (Winslow és Insel, 1990; Olivier és mtsai, 1998b), viszont Olivier és mtsai (1998b) vizsgálatában csak az alomhőmérséklet közeli mérőfelületen bizonyult hatékonynak, a nagyobb stresszt jelentő hidegebb felületen az anyag hatása nem volt szignifikáns, csak trendet mutatott, míg Winslow és Insel (1990) vizsgálatában többszöri adagolás után tolerancia alakult ki. A dezipramin egyes kísérletekben nem volt hatékony (Iijima és Chaki, 2005), míg más esetekben fokozta a vokalizációt (Winslow és Insel, 1990, Kehne és mtsai, 2000). Az imipraminnal nem sikerült hatást kimutatni (Hodgson és mtsai, 2008), más vizsgálatokban az anyag gyenge U alakú dózishatás görbét mutatott (Olivier és mtsai, 1998b). Ellentmondásosak az irodalmi eredmények a vazopresszin 1b receptor antagonistáknál szeparáció indukálta USV-re gyakorolt hatásával is. Bizonyos esetekben sikerült az anyaggal gátló hatást kimutatni (Hodgson és mtsai, 2007), míg egy másik kísérletben nem volt hatása (Iijima és Chaki, 2005). Az 5-HT₃ antagonisták (Kehne és mtsai, 1991; Olivier és mtsai, 1998b) és a haloperidol (Kehne és mtsai, 1991; Kehne és mtsai, 2000) nem gátolta a szeparáció kiváltotta USV-t.

2. táblázat. Az irodalomban leírt, újszülött patkányok szeparáció indukálta USV-jét gátló vegyületek

Típus	Vegyületnév	Irodalmi hivatkozások
5-HT _{1A} agonista hatású vegyület	8-OH-DPAT	Winslow és Insel, 1991; Olivier és mtsai, 1998b; Kehne és mtsai, 2000; Iijima és Chaki, 2005; Martino és Perkins, 2008
	Buspiron	Winslow és Insel, 1991; Olivier és mtsai, 1998b; Kehne és mtsai, 2000; Hodgson és mtsai, 2008
5-HT _{2A} agonista hatású vegyület	DOI	Winslow és Insel, 1991
SSRI	Citaloprá	Winslow és Insel, 1990; Hodgson és mtsai, 2008
	Fluoxetin	Starr és mtsai, 2007; Hodgson és mtsai, 2008,
	Fluvoxamin	Olivier és mtsai, 1998b; Iijima és Chaki, 2005
	Paroxetin	Winslow és Insel, 1990; Iijima és Chaki, 2005
GABA _A receptor NAM (benzodiazepinek)	Alprazolám	Olivier és mtsai, 1998a
	CDP	Olivier és mtsai, 1998a; Hodgson és mtsai, 2007; Hodgson és mtsai, 2008
	Diazepám	Kehne és mtsai, 1991; Olivier és mtsai, 1998a; Kehne és mtsai, 2000; Iijima és Chaki, 2005; Hodgson és mtsai, 2008
CB1 agonista hatású vegyület	CP 55940	McGregor és mtsai, 1996
CRF1 antagonist hatású vegyület	CP 154526	Kehne és mtsai, 2000; Iijima és Chaki, 2005; Hodgson és mtsai, 2007
mGlu5 receptor NAM	MPEP	Iijima és Chaki, 2005
	MTEP	Hodgson és mtsai, 2008
D2 receptor agonista hatású vegyület	7-OH-DPAT	Dastur és mtsai, 1999
	Kvinpirol	Dastur és mtsai, 1999
NMDA receptor gátló vegyület	AP5	Kehne és mtsai, 1991
	CPP	Podhorna és Brown, 2000
	MK-801	Kehne és mtsai, 1991

2.2.1.3. Ultrahangal kiváltott mozgási kitörések és mozdulatlaná dermedés gátlása

Mint azt a bevezetőben már említettem, nagy hangerősségű 22 kHz-es ultrahangokkal Lister Hooded patkányokból mozgási kitörések válthatók ki, míg a Wistar patkányok mozdulatlaná dermedési reakciót mutatnak 22 kHz-es ultrahang lejátszása után. A Lister Hooded törzs esetében nem csak a kiváltott viselkedés, hanem az agyi aktivációs mintázat is eltér a Wistar patkányoktól. Lister Hooded patkányokban a 22 kHz-es hangok hatására a c-fos fehérje aktiváció a periaqueductális szürke állomány (PAG) dorzális részében, valamint az amygdala egyes területein emelkedik meg (Beckett és mtsai, 1997; Neophytou és mtsai, 2000; Klein és mtsai, 2010), míg Wistar patkányokban a PAG ventrális része aktiválódik (Neophytou és mtsai, 2000). Mivel humán vizsgálatokban azt állapították meg,

hogyan a dorzális PAG játszik kulcsszerepet a pánikrohamok kialakulásában (Klein és mtsai, 2010), ez a különbség arra enged következtetni, hogy amíg a Lister Hooded patkányok mozgási kitörései pánik reakciók, addig a Wistar patkányok mozdulatlan dermedése szorongást tükröz. Ezt a feltételezést erősíti meg az a megfigyelés is, hogy a pánikrohamokhoz hasonlóan, az ultrahangnak kitett Lister Hooded patkányokban emelkedik a pulzus és testhőmérséklet, viszont nem emelkedik a plazma kortikoszteron szintje (Klein és mtsai, 2010). A mozgási kitörések mértékét csökkentette a diazepam, a CDP (Beckett és mtsai, 1996; Nicolas és mtsai, 2007), valamint a feszültségfüggő Ca-csatorna blokkoló pregabalin és gabapentin (Nicolas és mtsai, 2007). Ezek az anyagok klinikai vizsgálatokban is pánik csökkentő hatást mutattak (Klein és mtsai, 2010). Az alprazolám, a 3-[(2-metil-1,3-tiazol-4-il)etil]piridine (MTEP) a haloperidol, buspirone, morfin és a metabotróp glutamát (mGlu)_{2/3} agonista eglumegad szintén csökkentette a mozgási kitörések intenzitását, de csak olyan dózisokban, melyek már az állatok alap lokomotoros aktivitását is gátolták (Nicolas és mtsai, 2007). Az emberben is pánikrohamot előidéző johimbin fokozza a mozgási kitörések intenzitását (Beckett és mtsai, 1996).

A nociceptin receptor agonista 8-[(1*S*,3*aS*)-2,3,3*a*,4,5,6-hexahidro-1*H*-fenalen-1-il]-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]dekán-4-on (Ro64-6198) preklinikai modellekben szorongásoldó hatásának bizonyult, viszont nem csökkentette az ultrahang kiváltotta mozgási kitöréseket (Klein és mtsai, 2010). Míg az ebben a modellben hatékony diazepam csökkentette az ultrahangnak kitett patkányok dorzális PAG-jában kimérhető c-fos expresszió növekedést, a Ro64-6198 az amygdalában mutatott hasonló hatást (Klein és mtsai, 2010). A diazepam és a Ro64-6198 mozgási kitörésekre és a c-fos fehérje expressziós mintázatára gyakorolt eltérő hatása arra utal, hogy a mozgási kitörések mértéke szorongásoldással nem befolyásolható, gátlásukhoz egy specifikus, pánik csökkentő anyaghatás szükséges (Klein és mtsai, 2010).

A modellben még nem vizsgálták meg az SSRI-k hatását. Ezeket a vegyületeket szintén alkalmazzák pánikbeteg kezelésében, így ezek vizsgálata nagyban hozzájárulna a modell további validálásához.

Bár a mozgási kitörések nem csak 22 kHz-s frekvenciájú hangokkal válthatók ki (lásd 2.1.2. fejezet), a tesztekben mégis ezt a frekvenciát alkalmazzák. Ez a kísérletet végző személyek szempontjából praktikus, hiszen az ember ebben a frekvencia tartományban nem érzékeli a hangokat. Viszont a kísérletek szempontjából nem előnyös éppen azt a frekvenciát kiválasztani, melyen a patkányok a vészjelzéseiket adják, mivel az így kiváltott, nem a pánikhoz kapcsolódó válaszok befolyásolhatják az eredményeket.

Bár több vizsgálat arra utal, hogy a hanggal kiváltott mozgási kitörések jól modellezik a pánikrohamokat, nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a mozgási kitörések néhány állatnál görcsbe fordulnak át (Commissaris és mtsai, 1998a). Ezért nem kizárható, hogy a mozgási kitörés nem kifejezetten pánk jelenség, hanem a görcs előtti állapot (pre-convulsant running) (Commissaris és mtsai, 1998a). Néhány vizsgálat eredménye erre utal. Kis amplitúdójú hanggal kis mértékű mozgási kitörések válthatók ki, melyek intenzitása fokozható a görcskeltő sztrichninnel (Commissaris és mtsai, 1998a és 1998b) és PTZ-vel (Commissaris és mtsai, 1998a), illetve csökkenthető a görcsoldó gabapentinnel (Commissaris és mtsai, 1998b). Nagy hangerősség vagy hosszan tartó hang hatására a görcsök gyakorisága megnő, ezt fokozható szubkonvulsáns dózisú PTZ (Commissaris és mtsai, 1998b) és sztrichnin (Commissaris és mtsai, 1998a és 1998b) adagolásával, illetve csökkenthető pentobarbitállal (Commissaris és mtsai, 1998b). A kérdés tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Elképzelhető, hogy beállítható egy, a Wistar patkányok 22 kHz-es ultrahanggal kiváltott mozdulatlanra dermedésén alapuló szorongásmodell. Ezt a feltételezést erősít meg, hogy a benzodiazepin midazolámmal csökkenteni lehet az ultrahang indukálta mozdulatlanra dermedést (Nobre és Brandao, 2004). A modell validálásához további szorongásoldó anyagok tesztelése szükséges.

2.2.2. Felnőtt patkányok 22-24 kHz-es vokalizációján alapuló fájdalom modellek

A patkányok 22-24 kHz-es vokalizációját nem a kellemetlen inger, fájdalom váltja ki, hanem annak ismételt bekövetkezésétől való szorongás (lásd 2.2.1.1. fejezet). Mivel az USV intenzitása függ a szorongást kiváltó kellemetlen inger mértékével, az USV indirekt módon indikálhatja az elszenvedett kellemetlen inger, fájdalom erősségét. Többféle kísérleti elrendezést is leírtak az irodalomba, melyek ezen az elven működnek.

Ha patkányokban Freund adjuvánssal krónikus arthritist idéztek elő, és a dobozukba egy nagyobb méretű patkányt helyeztek, a nehezebb patkány agresszív viselkedésének hatására vokalizálni kezdtek (Calvino és mtsai, 1996). A Freund adjuvánssal nem kezelt kontroll állatok kevesebbet vokalizáltak, a Freund adjuvánssal kezelt állatok vokalizációit morfinnal és aszpirinnel csökkenteni lehetett (Calvino és mtsai, 1996). Egy hasonló kísérleti elrendezésben Freund adjuvánssal, karragénnel, és sztreptozotocin indukálta diabéteszsel kiváltott krónikus fájdalmat vizsgálták (Jourdan és mtsai, 2002). A krónikus fájdalomnak kitett állatok ebben a kísérletben is többet vokalizáltak, mint a kontroll csoport, de ebben az esetben az aszpirin nem csökkentette a vokalizációjukat.

Kaolin/karragénnel kiváltott ízületi fájdalom hatására, a karragénnel kezelt állatoknak mind a hallható, mind a 22-24 kHz-es tartományba eső vokalizációik mértéke magasabb volt a kontroll állatokéhoz képest, ha térdízületüket a kezelés előtt fájdalmat nem okozó (allodínia) és fájdalmat okozó (hiperalgécia) mechanikus stimulusokkal ingerelték (Han és mtsai, 2005).

A krónikus fájdalom mellett felmerült az a lehetőség is, hogy a patkányok ultrahangos vokalizációjára migrén modellt lehet alapozni (Martino és Perkins, 2008). Lipopoliszacharid intracerebro-ventrikuláris adagolása után az állatok fejére légfuvatot engedtek. Ennek hatására az állatok vokalizálni kezdtek, a lipopoliszachariddal kezelték többet vokalizáltak mint a kontrollok, és a vokalizációk mértéke arányos volt a légfuvat erősségével. A morfin, a zolmitriptán és a szumatriptán, csökkentette a lipopoliszachariddal kezelt állatok USV-jét, míg a szorongásoldó diazepám a kontroll csoportban is csökkenést indukált.

Bár az irodalmi adatok azt mutatják, hogy van lehetőség fájdalom modelleket alapozni a 22—24 kHz-es vokalizációkra, a hallható hangok mérése alkalmasabb lehet az ilyen célú vizsgálatokban, mert – tapasztalatunk szerint – azokat a fájdalom közvetlenül váltja ki, míg az USV-t inkább a fájdalmat okozó inger ismételt bekövetkezésétől való szorongás idézi elő.

3. Célkitűzések

3.1. Szorongásoldó anyagok gyógyszerfejlesztése során szűrésre alkalmas USV módszerek beállítása, összehasonlítása és alkalmazása

A gyógyszerfejlesztési folyamat célja egy kiválasztott hatásmechanizmuson keresztül működő, hatékony és mellékhatások tekintetében biztonságos vegyület kifejlesztése. A folyamat során számos molekulát szintetizálnak, melyek közül a legoptimálisabb kerül kiválasztásra. A kiválasztás egy szűrő rendszer (screening cascade) segítségével történik, mely különféle módszerekből áll. A sok vegyületet gyorsan szűrni képes eljárások a tesztrendszer elején helyezkednek el, míg a rendszer végén állnak a nagyobb munkaigényű, bonyolultabb és lassabb módszerek. Számos esetben azonban ezek a módszerek nagyobb prediktív értékkel bírnak. Ennek megfelelően a szűrés elején általában az in vitro, míg a szűrés végén az in vivo modellek dominálnak.

A viselkedésfarmakológiai szűrő módszereknél is fontos szempont a mérés munkaigénye, de itt már fokozottan előtérbe kerül a modellek translációs értéke, hiszen ezekkel a modellek kell megjósolni a tesztelt vegyületek majdani humán hatékonyságát.

Mint azt a bevezetésben már említettük, többféle szorongás paradigma is létezik, mely a felnőtt patkányok 22 kHz-es USV-jén alapul. Ezeket a modelleket szűrési tulajdonságaik szempontjából mindeztáig még nem hasonlították össze. Ezért beállítottuk az egyszeri és többszöri sokkolásos, valamint a sokkolási környezethez társításos USV modelleket, és szűrési jellemzőik alapján összevetettük azokat.

3.1.1. A megfelelő sokkolási intenzitás, patkánytörzs és állat beszállító kiválasztása a módszerek beállításához

Az optimális áramerősség kiválasztása mind állatvédelmi, mind kísérletezési szempontból fontos. Egyrészt törekedni kell arra, hogy a mérés során a kísérleti állatok a lehető legkevesebb kellemetlen behatásnak legyenek kitéve, másrészt olyan intenzitású sokkolást kell alkalmazni, ami megfelelően stabil USV szintet vált ki a kontroll csoportban. Ezért megvizsgáltuk a sokkok számának és áramerősségének hatását a kiváltott USV szintjére.

Szintén nagy jelentősége van a megfelelő patkánytörzs kiválasztásának, mivel különböző patkánytörzsek vokalizációjának mértékéke eltérő lehet. Patkánytörzsek ilyen jellegű összehasonlításáról irodalmi adat nem áll rendelkezésre. Ezért megvizsgáltuk

különböző törzsekbe tartozó, illetve különböző beszállítóktól származó patkányok vokalizációját azonos sokkolási körülmények között.

3.1.2. A tesztprotokollok összehasonlítása

Az irodalmi adatok alapján anyagtesztelésre leggyakrabban a többszöri sokkolásos elrendezéseket használják. Társításos és elősokkolás nélküli protokollokat csak elvétve használtak anyagtesztelésre (lásd 1.2.1.1. fejezet), pedig nem zárható ki, hogy egyes szorongásoldók más hatásprofilot mutatnak a különböző elrendezésekben.

A tesztprotokollok összehasonlítása során elsősorban az SSRI-k hatására fókuszáltunk, mely vegyületeket számos hangulati megbetegedés kezelésére alkalmazzák (Vaswani és mtsai, 2003). A humán alkalmazás során az SSRI-k csak krónikus adagolás után fejtik ki szorongásoldó, illetve antidepresszáns hatásukat, akut adagolás után hatástalanok, vagy gyakran fokozzák a szorongásos tüneteket (Vaswani és mtsai, 2003). Ennek a jelenségnek a farmakológiai háttere egyelőre még nem tisztázott.

Szemben a klinikai tapasztalatokkal, a preklinikai adatok ellentmondásosak az SSRI-k akut adagolás utáni hatásáról. Bizonyos vizsgálatokban a klinikai eredményeknek megfelelően az SSRI-k akut adagolás után szorongáskeltő hatást mutattak (Dekeyne és mtsai, 2000; Silva és Brandpo, 2000; Bagdy és mtsai, 2001; Andó és mtsai, 2010), míg más vizsgálatokban szorongásoldónak bizonyultak (Nishikawa és mtsai, 2007; Starr és mtsai, 2007; Hodgson és mtsai, 2008; Muraki és mtsai, 2008), vagy vegyes, szorongásoldó/szorongáskeltő hatásokat tapasztaltak (Sanchez és Meier, 1997; Gravius és mtsai, 2006). Ezért felmerült annak a lehetősége, hogy ezek az anyagok a különböző USV tesztbeállításokban eltérő hatást mutathatnak.

A fluvoxamin kivételével az SSRI-k akut hatását korábban kizárólag többszöri sokkolásos elrendezésű USV modellekben vizsgálták (1. táblázat), ahol szorongásoldó hatásuk volt. A fluvoxamint egyetlen vizsgálatban, egy sokkolási környezethez társításos elrendezésben is tesztelték, ahol szignifikánsan csökkentette az USV-t (Molewijk és mtsai, 1995). SSRI-t elősokkolás nélküli, egyszeri sokkolásos beállítással az irodalmi adatok alapján még nem tesztelték.

A kísérleteinkben (Kassai és Gyertyán, 2012) négy SSRI-t (fluoxetin, szertralin, paroxetin és escitaloprám), illetve a klinikumban szorongásoldóként alkalmazott benzodiazepin alprazolám, valamint az USV tesztekben számtalanszor tesztelt 5-HT_{1A} agonista 8-OH-DPAT hatását vizsgáltuk elősokkolás nélküli, többszöri sokkolásos és a sokkolási környezethez társításos USV paradigmákban. Az irodalmi adatok alapján utóbbi

két vegyület hatékonyan csökkentette az USV-t a sokkolási környezethez társításos paradigmában (Molewijk és mtsai, 1995), míg a 8-OH-DPAT hatékonynak bizonyult többször sokkolt elrendezésekben is (De Vry és mtsai, 1993; Sanchez, 1993; Jolas és mtsai, 1995; Bartoszyk és mtsai, 1997; Schreiber és mtsai, 1998; Sanchez és Mork, 1999; De Vry és mtsai, 2004).

Célul tűztük ki a fent említett kísérletek eredményei, és a protokollok tesztelési kapacitása alapján a szűrésre legalkalmasabb kísérleti elrendezés kiválasztását.

3.1.3 A többszöri sokkolásos modell szűrőműszerként történő alkalmazása

Az USV paradigmákban korábban nem vizsgált anyagok és hatásmechanizmusok tesztelése fontos feladat, mivel nem csak az adott vegyületek szorongásoldó profiljának feltárásához szolgáltat új információt, hanem hozzájárul a modell további validálásához is.

Az mGlu₅ receptor negatív allosztérikus modulátorai számos állatmodellben mutattak szorongásoldó hatást (Busse és mtsai, 2004; Klodzinska és mtsai, 2004; Nordquist és mtsai, 2007), továbbá a fenobám emberben is hatékony szorongásoldónak bizonyult (Porter és mtsai, 2005). Az irodalmi adatok alapján az mGlu₅ NAM-ok közül a felnőtt patkány USV modellben csupán a 2-metil-6-(feniletinil)-piridin-t (MPEP) vizsgálták meg egy kulcsingerhez társításos paradigmában (Brodkin és mtsai, 2002). Ezért mind az MTEP-et, mind az MPEP-et teszteltük a többszöri sokkolásos beállításban.

Az 5-HT_{2C} receptor antagonisták antidepresszáns és szorongásoldó hatást mutattak állatmodellekben (Kennett és mtsai, 1997; Kántor és mtsai, 2005; Harada és mtsai, 2006). Averzív környezet indukálta USV modellben a szelektív 5-HT_{2C} agonista (8aS,12aR)-2-(2,6-Difluorofenil)-5,6,7,8,8a,9,10,11,12,12a-dekahidro-pirido[3',4':4,5]pirrolo[1,2,3-ef][1,5]benzotiazepin (IL-639) akárcsak a nem szelektív 5-HT_{2A/2C} agonista 1-(3-klorofenil)piperazin (mCPP) a bazolaterális amygdalába adagolva anxiogén hatást mutatott (Campbell és Merchant, 2003). Az mCPP hatását a szisztémásan adagolt 5-HT_{2C} antagonistá 6-kloro-5-metil-N-[6-(2-metilpiridin-3-iloxi)piridin-3-il]indolin-1-karboxamid (SB-242084) csökkentette (Campbell és Merchant, 2003). Ugyanakkor egy másik 5-HT_{2C} antagonistá vegyület, az N-piridin-3-il-1,2-dihidro-3H-benzo [e]indol-3-karboxamid (S32006) önmagában adva nem csökkentette az USV-t szisztémás adagolás után sokkolási környezethez társított paradigmában (Dekeyne és mtsai, 2008). Az SB-242084-et önmagában még nem vizsgálták USV modellben, ezért a vegyületet a többszöri sokkolásos protokollal teszteltük.

Vizsgáltuk továbbá az 5-HT_{5A} antagonizmus hatását a felnőtt patkányok USV-jére. Reuter és mtsai, (2006) egy konferencia poszteren bemutatták, hogy az N-(2,6-dimetoxibenzil)-N0[4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il]guanidin (A-843277) anxiolitikus hatást mutatott a Vogel tesztben. Így elképzelhető, hogy az 5-HT_{5A} antagonizmusnak szorongásoldó hatása van. Ezért a két elérhető, és viszonylag szelektív antagonistát, az A-843277-t és az N-[2-(dimethylamino)etil]-N-[[40-[[2-(feniletil)amino]metil][1,10-bifenil]-4-il]metil] ciklopentánpropanamid dihidroklorid-ot (SB-699551) teszteltük a többszöri sokkolásos paradigmában.

A korábban még nem vizsgált vegyületek anxiolitikus profilját, egyrészt a tesztparadigmák összehasonlításánál referencia vegyületként használt 8-OH-DPAT-hez és alprazolamhoz, valamint három másik, a klinikán használt szorongásoldó anyaghoz, a GABA_A pozitív allosztérikus modulátor diazepámhoz és CDP-hez, illetve az 5-HT_{1A} parciális agonista buspironhoz viszonyítottuk.

3.2. Az MTEP és rimonabant együttes hatásának vizsgálata

Az elhízás világszerte az egyik legfontosabb egészségügyi kérdés (WHO, 2013), melynek kezelésére hatékony gyógyszeres terápia jelen pillanatban nem áll rendelkezésre. Néhány évvel ezelőtt úgy tűnt, hogy a táplálékfelvételt jelentős mértékben csökkenteni képes CB₁ antagonista hatású vegyületek (Christensen és mtsai, 2007; Addy és mtsai, 2008) áttörést hozhatnak ezen a területen. Azonban kiderült, hogy a rimonabant, az első CB₁ antagonista mely piacra került, súlyos depressziós és szorongásos tüneteket okoz (FDA, 2007), ezért ezt az anyagot a piacról visszavonták. Egy másik CB₁ antagonista, a taranabant hasonló mellékhatásokat mutatott (Addy és mtsai, 2008).

A mellékhatások kiküszöbölésére különböző elképzelések születtek, úgymint neutrális antagonisták fejlesztése, melyek, szemben az inverz agonista rimonabanttal és taranabanttal, nem gátolják a CB₁ receptorok konstitutív aktivitását (Janero és Makryannis, 2009), vagy kizárólag perifériásan ható vegyületek szintézise (Pavon és mtsai, 2006).

Egy másik, eddig kevésbé vizsgált lehetőség kombinálni a CB₁ antagonizmust egy másik receptorhatással, mely kivédi a mellékhatásokat. Az irodalmi adatok alapján erre az mGlu₅ antagonizmus megfelelő lehet. Az mGlu₅ receptorok gátlása szorongásoldó hatású állatmodellekben (Busse és mtsai, 2004; Klodzinska és mtsai, 2004; Nordquist és mtsai, 2004) és emberben (Porter és mtsai, 2005), valamint állatmodellekben a táplálékfelvétel csökkentő hatását mutatták ki (Bradbury és mtsai, 2005). Az mGlu₅ antagonizmus viszont memóriaromlást okoz (Homayoun és mtsai, 2004; Gravius és mtsai, 2005; Steckler és

mtsai, 2005a; Christoffersen és mtsai, 2008). Ezzel szemben a CB₁ receptorok antagonisták memóriajavító hatását több állatmodellben is kimutatták (Zanettini és mtsai, 2011). Immunhisztokémiai vizsgálatok alapján megállapították, hogy az I típusú metabotróp glutamát receptorok (mGlu₁ és mGlu₅) (Shigemoto and Mizuno, 2000) és a CB₁ receptorok (Howlett és mtsai, 2004) elterjedése átfed a központi idegrendszerben, valamint több szignalizációs utat is leírtak, melyben mindkét receptor szerepet játszik (Chevalleyre és mtsai, 2006; Castillo és mtsai, 2012).

Mindezek alapján elképzelhető, hogy a két receptorhatás kombinációja, amellettt hogy fokozott táplálékfelvétel gátló hatást eredményez, mentes lehet a szorongáskeltő és memóriarontó mellékhatásoktól.

A fenti hipotézis teszteléséhez beállítottunk egy felnőtt patkányok USV fokozásán alapuló anxiogenitás modellt, valamint egy sokkolási környezethez társításos memória modellt. Referens vegyületként az mGlu₅ antagonista MTEP-et és a CB₁ antagonista rimonabantot használtuk a kísérletekben.

3.2.1. Felnőtt patkányok USV-jének fokozásán alapuló anxiogenitás modell beállítása

Míg a szorongáscsökkentő hatású vegyületekkel az USV csökkenthető, a szorongáskeltő vegyületek emelik az USV szintjét. USV modellekben szorongáskeltő anyaghatásokat elsősorban az újszülött patkányok 35-40 kHz-es vokalizációjának fokozásán keresztül sikerült kimutatni, de az erre vonatkozó irodalmi adatok mennyisége eléggé behatárolt. A CB₁ receptor antagonista hatású rimonabant (McGregor és mtsai, 1996), az α 2 adrenoceptor agonista klonidin (Nazarian és mtsai, 2001; Krall és mtsai, 2005), valamint az 5-HT_{2A} antagonista ketanszerin és ritanszerin (Winslow és Insel, 1991; Olivier és mtsai, 1998b) fokozta az újszülött patkányok USV-jét. Nem növelte viszont az USV-t a szorongáskeltő hatású GABA_A receptor antagonista flumazenil, FG7142 és a PTZ (Kehne és mtsai, 1991; Olivier és mtsai, 1998a).

A 22-24 kHz-es USV fokozásáról még kevesebb információ áll rendelkezésre. Az FG7142 nem növelte az USV-t, ezzel szemben a PTZ emelő hatást mutatott (Jelen és mtsai, 2003). A rimonabant a bazolaterális amygdalába adva növelte az USV-t a sokkolási környezethez társított dermedési reakció tesztben (Roche és mtsai, 2007), viszont egy másik vizsgálatban a CB₁ agonista hatású CP55940 szintén hasonló hatást mutatott (Arnold és mtsai, 2010). Fokozó hatást mutatott a 5-HT_{2A/2C} agonista mCPP (Campbell és Merchant, 2003), illetve az 5-HT_{2C} agonista IL-639 a bazolaterális amygdalába adagolva (Campbell és Merchant, 2003).

Egy olyan modell beállítását tűztük ki célul, ahol egy gyenge intenzitású sokkolással kiváltott alacsony szintű USV mértéke anxiogén anyagokkal fokozható. Ehhez az egyszerű sokkolásos elrendezést vettünk alapul, ahol a sokkolás erősségét lecsökkentettük. Az így kialakított modellben teszteltük a PTZ-t, valamint a CB₁ antagonistát rimonabantot és (-)ibipinabantot, továbbá ez utóbbi anyag inaktív izomerjét, a (+)ibipinabantot is.

GABA_B receptor agonista baclofen is számos állatmodellben mutatott anxiolitikus hatást (Shephard és mtsai, 1992; Andrews és mtsai, 1993), továbbá számos adat arra utal, hogy ennek az anyagnak emberben is anxiolitikus hatása lehet (Hinderer, 1990; Krupitsky és mtsai, 1993; Drake és mtsai, 2003). Ennek megfelelően elképzelhető, hogy a GABA_B antagonisták szorongás keltő hatásúak. Ezért a beállított modellben a GABA_B antagonistát (+)-2-(5,5-dimetilmorfolin-2-il)ecetsav hidrokloridot (SCH50911) is teszteltük.

3.2.2. Memóriarontó és -javító anyagok hatásának vizsgálata a sokkolási környezethez társított USV akvizíciójára

Az irodalmi adatok alapján, szemben a sokkolási környezethez társított dermedési reakcióval, a sokkolási környezethez társított USV-t elvétele használják a félelmi memória tesztelésére. Kimutatták, hogy a kortikotropin serkentő hormon 1-es típusú receptorának farmakológiai gátlása (Kikusui és mtsai, 2000), illetve egyes agyi régiók léziója (Antoniadis és McDonald, 2006) rontotta a környezethez társított USV akvizícióját.

Mivel nem kizárt, hogy dermedés reakció mellett az USV szintén jól használható memória modellben, teszteltük a rimonabant és az MTEP hatását a sokkolási környezethez társított USV akvizíciójára. Számos vizsgálatban kimutatták, hogy az mGlu₅ receptor gátló vegyületek rontják (Homayoun és mtsai, 2004; Gravius és mtsai, 2005; Steckler és mtsai, 2005b; Christoffersen és mtsai, 2008), CB₁ antagonisták pedig javítják a memóriát számos állatmodellben (Zanettini és mtsai, 2011), így az MTEP-től rontó, a rimonabantól javító hatást vártunk. Ezen a két anyagon kívül teszteltük még az NMDA receptor gátló (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cikloheptén-5,10-imint (MK-801), melyet gyakran használnak memória rontó ágensként különféle memória modellekben (Caramonos és Shapiro, 1994; Gould és mtsai, 2002; Bernaerts és mtsai, 2004).

3.2.3 Az MTEP és a rimonabant együttes hatásának vizsgálata a szorongásra és a memóriára

Az egyszeri sokkolásos USV paradigmával teszteltük, hogy a rimonabant képes-e csökkenni az MTEP szorongásoldó hatását, míg az anxiogenitás modellben azt vizsgáltuk, hogy az MTEP adagolásával csökkenthető-e a rimonabant szorongás fokozó hatása.

A környezethez társításos USV modell akvizíciós paradigmájában vizsgáltuk, hogy a rimonabant adagolásával visszafordítható-e az MTEP memóriarontó hatása.

3.3. 22-24 kHz-es ultrahanggal kiváltott dermedési reakció vizsgálata

22-24- kHz-es ultrahanggal kiváltott dermedési reakción alapuló, validált szorongásmodell jelenleg nincs leírva az irodalomban. Megvizsgáltuk, hogy ezen elv alapján kiváltható-e olyan mértékű dermedés, amely már alkalmas lehet szorongásoldó anyagok tesztelésére.

Nem találtunk olyan publikációt az irodalomban, melyben célzottan azt vizsgálták volna, hogy a 22-24 kHz-es USV visszajátszása vagy a mesterségesen generált 22 kHz-es ultrahangok lejátszása vált-e ki hosszabb idejű dermedést. Egy tanulmányban ugyan összehasonlították a természetes és mesterséges hangokat, de itt a hangokat, mint feltételes ingereket alkalmazták a feltételes ingerhez társításos félelem kondicionálás teszt paradigmában (Lindquist és mtsai, 2004). A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a perirhinális kéreg léziója rontja az akvizíciót abban az esetben, ha feltételes inger természetes USV volt, míg a lézió nem befolyásolta az akvizíciót abban az esetben, ha a feltételes inger az 22 kHz-es generált ultrahang vagy az emberi fül számára is hallható tartományba eső hang volt (Lindquist és mtsai, 2004).

Mint már azt 1.2.1.1. fejezetben említettük, az USV-t nem folyamatosan, hanem „sorozatokban” adják ki az állatok. Így elképzelhető, hogy a szakaszosan és folyamatosan lejátszott generált ultrahangoknak különböző mértékben fokozhatják a dermedési reakciót. Ennek a kérdésnek a megválaszolására irányuló vizsgálatot szintén nem találtunk az irodalomban. Egy tanulmányban ugyan összehasonlították a szakaszosan és folyamatosan lejátszott mesterséges hangokat, de ebben a vizsgálatban is feltételes stimulusként alkalmazták a feltételes ingerhez társításos félelem kondicionálást tesztben (Kholodar-Smith és mtsai, 2008). Az eredmények azt mutatták, hogy a perirhinális kéreg léziója rontja az akvizíciót szakaszosan lejátszott hangok esetében, de nem befolyásolta a folyamatos hangoknál. Az előbb említett két vizsgálattal kapcsolatban érdemes

megjegyezni, hogy a vészfrekvencián szóló hangok önmagukban is dermedési reakciót válthatnak ki, ezért nem feltétlenül a legalkalmasabbak feltételes stimulusnak.

A fentiek alapján, összehasonlítottam a visszajátszott természetes vokalizációk és mesterséges ultrahangok hatását, illetve teszteltem, hogy a folyamatosan és szakaszosan lejátszott hangokkal váltható-e ki nagyobb mértékű dermedés.

4. Anyag és módszer

4.1. Az állatok

A patkányokat négyesével sztenderd méretű, fémrács tetejű, műanyag falú dobozokban, klimatizált állatszubában (22 ± 2 °C, 12-h világos/sötét ciklus, a világos szakasz kezdete reggel 6 óra) tartottuk. *Ad libitum* fértek hozzá a táplálékhoz (Spezialdiäten GmbH ssniff R/M+H tápja, 105°C-on autoklávozva) és az ivóvízhez. Érkezési súlyuk 220-250 g volt. A kísérletek előtt legalább 4 napig akklimatizálódtak a tartási körülményekhez. A különböző törzsekbe tartozó és különböző beszállítóktól származó állatok összehasonlító vizsgálatában Hannover Wistar [HsdBrIHan:Wistar] (Toxicoop, Harlan, Janvier Elevage), Charles River Wistar [CrI(W)Br] (Toxicoop), Sprague dawley [Hsd:SD(SPRD)] (Harlan), Lister Hooded [CrI:LIS] (Harlan) és Long evans [CrI:LE] (Janvier Elevage) patkányokat használtunk. A többi kísérletet Hannover Wistar (Harlan) patkányokon végeztük. Az állatokon elvégzett vizsgálatokat a helyi állatvédelmi bizottság jóváhagyta, valamint megfelelnek az 1998/XXVIII., az állatok védelméről és azok kíméletéről szóló törvény, illetve a 243/1998-as, az állatkísérletek végzéséről szóló kormányrendelet irányelveinek.

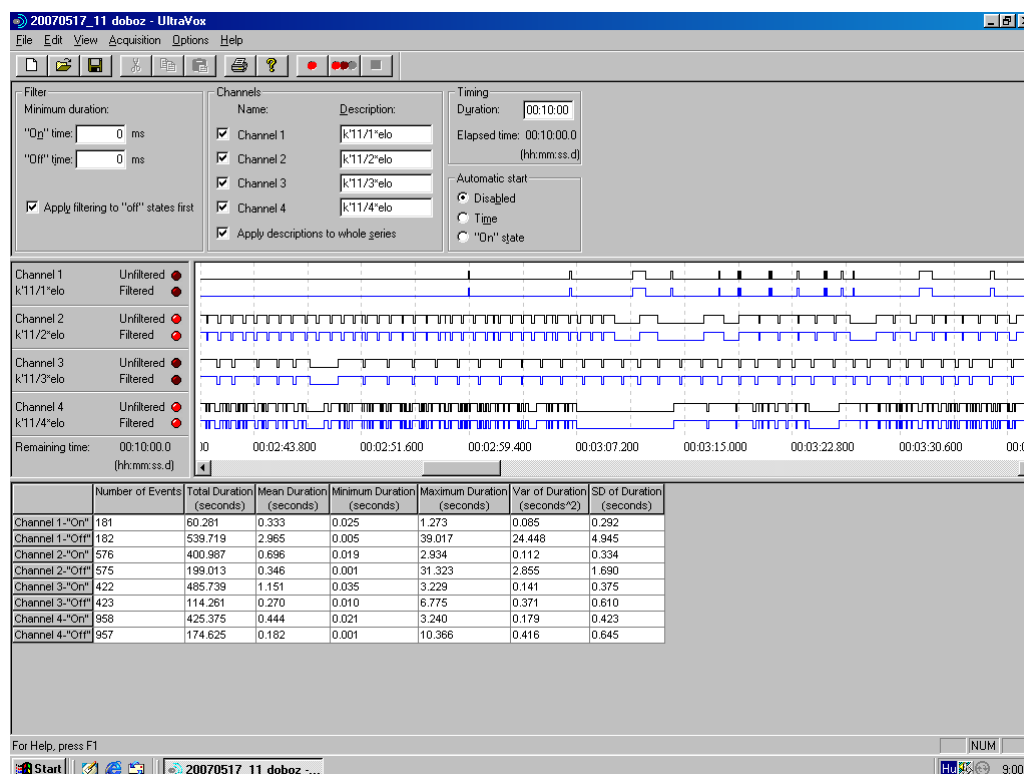
4.2. Eszközök

4.2.1. Sokkoló kamrák és az USV detektáló és feldolgozó rendszer

A sokkolások négy darab 30×30×20 cm-es műanyag falú sokkoló kamrában történtek. Az állatok a talpsokkot a kamrák alján található, rozsdamentes acélból készült rácsokon keresztül kapták. A sokkoláshoz LE 100-26 (Panlab) típusú sokkgenerátort alkalmaztunk, mely a rácsra söprő áramot adott ki. A kamrák 74×58×42 cm-es hangszigetelt dobozba voltak helyezve, ami megakadályozta, hogy az ultrahangok a szomszédos kamrákból átjussanak.

Az USV mérése Ultravox™ rendszerrel (Noldus Information Technology, The Netherlands) történt. Az USV-t a négycsatornás rendszer Mini-3 denevér detektorokkal érzékeli (Ultra Sound Advice™). A ± 4 kHz sávszélességű detektorokat 23 kHz-re állítottuk be. A detektorok a jeleket egy audio-filter egységhez (audio-input/TTL output) továbbították, ahol az amplitúdó küszöb 0,6-ra lett beállítva (ez az érték 450 mV-os jelerősségnek felel meg). Az egység a detektorokon érzékelt hangokat igen-nem jelekké

konvertálta, majd azokat egy PC-hez továbbította. A PC-re beérkező adatok rögzítése az Ultravox programmal történt (2. ábra). A program a mérés során többféle változót is rögzített. Az adatelemzéshez a mérés alatt elhangzott vokalizációk teljes időtartamát használtuk.



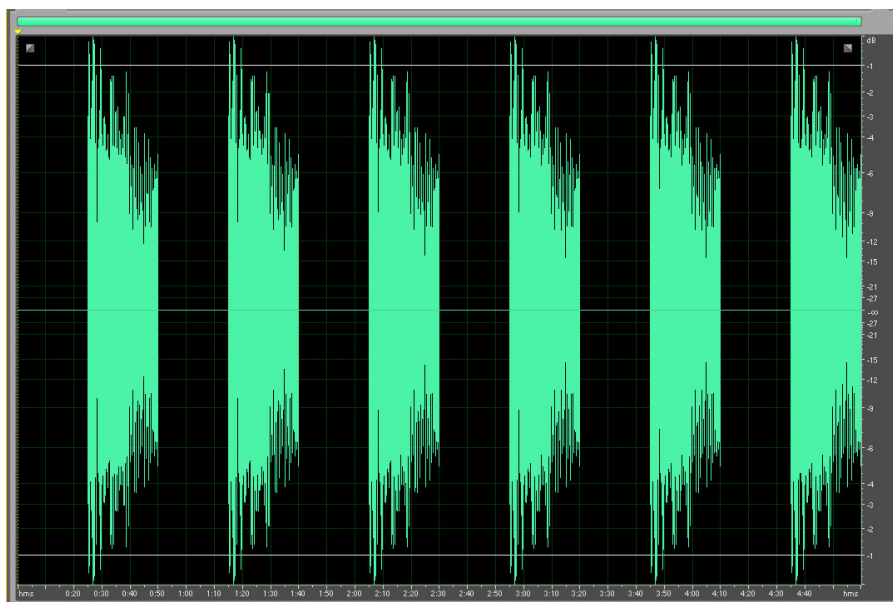
2. ábra. Az Ultravox program felhasználói felülete. A képernyő felső harmadában a mérés beállításai láthatóak, a középső harmadában a négy csatornán detektált USV-eket ábrázolja a program az idő függvényében, az alsó harmadban pedig az összesített adatokat jeleníti meg.

4.2.2. USV felvevő-lejátszó rendszer és az ultrahang kiváltotta viselkedési válaszok vizsgálata

A kísérletekhez egy 235 g-os Hannover Wistar (Toxicoop) patkány talpsokkal kiváltott USV-jét vettük fel. A felvétel Microtrack II. digitális diktafonnal készült. A digitális wav kiterjesztésű fájlt PC-re töltöttük. A szoftveres zajszűrés valamint a fájl szerkesztése (megfelelő hosszúságú vokalizáció szakaszok kialakítása) az Adobe Audition programmal történt. A mesterséges, 23 kHz-es szinusz hullámú hangok generálását illetve szerkesztését szintén ezzel a programmal végeztük el. A mesterséges hangok relatív hangereje -3 dB volt. Mivel a természetes, felvett hangok amplitúdója nem konstans, a természetes hangok átlag hangerejét -3 dB alá állítottuk be annak érdekében, hogy elkerüljük a torzítást a lejátszás során (3. ábra). A tisztított és szerkesztett monó

hangfájlokat a diktafonra csatlakoztatott MAC AudioMPx200 erősítőn keresztül egy Piezo TE-300-as hangszóró segítségével játszottuk le.

Az állatok viselkedését egy 35 × 35 × 50 centiméteres műanyag falú dobozban kamerarendszeren keresztül figyeltük meg. A hangszórót a doboz felső sarkában rögzítettük.



3. ábra. A természetes USV amplitúdó változása. A vízszintes tengely az időt, a függőleges tengely a relatív hangerősséget mutatja. A grafikonon jól látszik, hogy az USV szakaszokban a hangerősség változó. Ezt a 25 másodperc csend/25 másodperc USV szakaszokra összevágott hangfájlt az ultrahanggal kiváltott mozdulatlanra dermedés kísérletekben alkalmaztuk.

4.3. Kísérleti elrendezések

A 4.3.2.-es fejezetben leírt többszöri sokkolásos elrendezés önkontrollos volt. Minden egyéb elrendezésben külön kontroll csoportot alkalmaztunk. Anyagtesztelés esetén a kontroll csoport vehikulus kezelést kapott.

4.3.1. Az egyszeri sokkolásos elrendezés

Az állatok a mérés előtt a tartóhelyiségből átkerültek az előkészítő szobába, ahol a kezelések a sokkoló kamrába tételt megelőzően történtek. A sokkolásokat és az USV méréseket egy külön szobában végeztük. A sokkoló kamrába helyezés után a patkányok talpsokkokat kaptak. Az első sokk előtti explorációs idő 30 másodperc, a sokkok közötti intervallum 10 másodperc volt. Az USV mérése az utolsó sokkot követően 10 percig tartott. Ebben a beállításban egy adott állat csak egy mérésben vett részt.

Ebben az elrendezésben vizsgáltuk 3×5-ös mintázatban a sokkok számának (1-6-12) és a sokkok áramerősségének (0,2-0,4-0,6-0,8-1 mA) hatását a kibocsátott USV mértékére. Az eredmények alapján a szorongásoldó anyagok hatásának tesztelésére a 0,6 mA-es 6 áramütéses, a szorongás keltő anyagok vizsgálatára pedig egy gyengébb, 0,4 mA-es 1 áramütéses sokkolást választottunk.

4.3.2. A többszöri sokkolásos elrendezés

Ez az elrendezés néhány apróbb módosítástól eltekintve hasonló ahhoz a protokollhoz, amit 1993-ban Sanchez írt le (Sanchez, 1993). Ebben a kísérleti elrendezésben az állatok sokkolása hetente kétszer, két egymást követő napon történt. Az egyes napokon alkalmazott sokkolási procedúra és az USV mérés teljes mértékben megegyezett az egyszeri sokkolásos elrendezésben leírtakkal. Az állatok egy sokkolási napon 6 áramütést kaptak 0,6 mA-es áramerősséggel. Az első héten az állatok habituálódtak a kísérleti protokollhoz, kezelés ezen a héten nem volt. Az anyagok tesztelése a második héten kezdődött. A mérés önkontrollos elrendezésű volt, az első sokkolás napon (kontroll nap) mért USV-t tekintettük a kontroll értéknek. Az anyagadás a második napon történt (kezelési nap), az egyszeri sokkolásos elrendezéshez hasonlóan a sokkoló kamrába tétel előtt. Azokat az állatokat, amelyek vokalizációja 100 másodperc alatt volt a kontroll napon, kihagytuk az anyagtesztelésből. Az anyagok tesztelése ezzel a módszerrel folytatódott a rákövetkező hetekben. A kísérleti elrendezésnek megfelelően egy hét kimosási idő volt a kezeléseik között. Ugyanaz az állat sohasem kapta kétszer ugyanazon anyag ugyanazon dózisát. Az állatok maximum négy anyagtesztelésen mentek keresztül, azaz a habituációs hetet is beleszámítva, maximum 5 hétig voltak a kísérletben. Ebben az időszakban a sokkok kiváltotta USV szintje a kontroll napokon stabil volt. Ezzel az önkontrollos elrendezéssel a kísérletekben felhasznált állatok számát jelentős mértékben csökkenteni tudtuk.

4.3.3. A sokkolási környezethez társításos elrendezés

Ebben az elrendezésben az állatok sokkolása két egymást követő napon (tréning nap) történt. A sokkolási procedúra teljes mértékben megegyezett az egyszeri sokkolásos elrendezésben leírtakkal. A tréning napokon az állatok 6 áramütést kaptak 0,6 mA-es áramerősséggel. A harmadik napon (expressziós nap) az állatokat ismét visszahelyeztük a sokkoló kamrába, de ekkor sokkot nem kaptak. Az expressziós napon az USV mérése szintén 10 percig történt, a mérés kezdete ebben az elrendezésben a dobozba helyezés

időpontja volt. A szorongásoldó anyagok tesztelésénél az anyagokat az expressziós napon adtuk a sokkoló kamrába tétel előtt. Ebben az esetben azokat az állatokat kihagytuk a mérésből, melyek 100 másodpercnél kevesebbet vokalizáltak a második tréning napon.

Az elrendezés akvizíciós paradigmájában a vegyületek memóriarontó és -javító hatását teszteltük. Ebben a paradigmában az anyagadások mindkét tréning napon, a sokkolást megelőzően történtek, míg a retenciós napon nem adtunk anyagot az állatoknak. Értelemszerűen ezeknél a teszteknel egyetlen állatot sem szelektáltunk ki a mérésből az akvizíciós napokon mért USV szintek alapján.

4.3.4 22-24 kHz-es ultrahanggal kiváltott dermedés vizsgálata során alkalmazott kísérleti elrendezések

Az 5 perces megfigyelés alatt a dermedés (teljes mozdulatlanság, kivéve a bajusz mozgatása és a respirációhoz szükséges mozgások) időtartama került rögzítésre. Három kísérletet végeztünk. Mindhárom kísérletben a különféle ultrahangoknak kitett csoportok mellett ultrahangnak nem kitett kontrollcsoportot alkalmaztunk.

Az első kísérletben a mesterségesen generált ultrahangok szakaszos lejátszásának mozdulatlanná dermedésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Hat állatcsoportnak mutattunk be 23 kHz-es generált ultrahangot. Az egyik csoportnak folyamatos ultrahangot, a további 5 csoportnak 2,5, 5, 10, 25, vagy 50 másodperces ultrahang szakaszokat játszottunk le. A szakaszok közötti intervallum hossza azonos volt a szakaszok hosszával.

A második kísérletben a 25 másodperc hosszú ultrahang impulzusok frekvenciájának mozdulatlanná dermedésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Három állatcsoportnak 18, 23, vagy 28 kHz-es hangokat játszottunk le.

A harmadik kísérletben a természetes és a mesterséges ultrahangok hatását vizsgáltuk. Ebben a kísérletben egy csoportnak folyamatos természetes USV-t, egy csoportnak 25 másodperces természetes USV szakaszokat, egy csoportnak pedig 25 másodperces 23 kHz-es generált ultrahang szakaszokat játszottunk le.

4.4 Tesztelt vegyületek adagolása és oldása

Orális adagolásnál (p.o.) 5 ml/kg, intraperitoneális adagolásnál (i.p.) 2 ml/kg, szubkután adagolásnál (s.c.) 1 ml/kg térfogatban, rendre 60, 30, illetve 20 perces előkezelési idővel adtuk be az oldatokat. Oldószernek fiziológiás sóoldatot vagy desztillált vizet használtunk. Amennyiben az anyag oldékonysága megkívánta, az oldószerhez 2% vagy 5% Tween80-at adtunk. Mivel az SB-699551 vegyületet az előbb említett módokon

nem lehetett beoldani, ezt az anyagot 25% (2-hidroxipropil)- β -ciklodextrin/desztillált vízben oldottuk.

4.5 Statisztika

A sokkolás erőssége és a kiváltott USV közötti összefüggéseket vizsgáló kísérletben az adatok elemzéséhez két utas ANOVA-t használtunk, ahol az egyik faktor az ütésszám, a másik faktor az áramerősség volt. A csoportok közötti különbségeket post hoc Duncan próbával teszteltük.

A patkánytörzsek és a beszállítók közötti különbségek összehasonlításánál, valamint az ultrahanggal kiváltott mozdulatlan dermedés vizsgálatánál egy utas ANOVA-t alkalmaztunk, melyet Duncan post hoc teszt követett.

A teszt-protokollok összehasonlításánál, az összes kísérlet kontrollértékeit protokollonként átlagoltuk. A többszöri sokkolásos elrendezésnél, mivel az állatok több kísérletben is részt vettek, egy állatnak több kontrollértéke is lehetett. Ilyen esetekben ezeknek az értékeknek az átlagát tekintettük az adott állathoz tartozó kontroll értéknek. Az így kumulált kontrollokat egy utas ANOVA-val hasonlítottuk össze, melyet Duncan post hoc teszt követett.

Mind a szorongás oldó, mind a szorongás keltő anyagok vizsgálatánál, az egyszeri sokkolásos elrendezésben az adatokat egy utas ANOVA-val elemeztük. A kontroll csoport és a kezelt csoportok közötti különbséget post hoc Dunnett próbával teszteltük. Szintén ilyen statisztikát alkalmaztunk a sokkolási környezethez társításos elrendezésben, mind a szorongásoldó mind a memóriára ható anyagok tesztelésénél. Ez alól kivétel az MTEP-rimonabant koadminisztrációs kísérlet, ahol két utas ANOVA-t használtunk. A többszöri sokkolásos elrendezésben, dózisonként, a kontroll nap és a kezelt nap adatait páros t-teszttel hasonlítottuk össze. A t-tesztek p értékeire Holm féle korrekciót alkalmaztunk.

A szorongás oldó anyagok USV gátlását a kontroll csoporthoz (a többszöri sokkolásos elrendezés esetében a kontroll naphoz) viszonyított százalékos értéként is kiszámoltuk. Az így kapott értékekhez, ha lehetséges volt, egyenest illesztettünk és a regresszió alapján ED_{50} értékeket számoltunk.

5. Az eredmények bemutatása és megvitatása

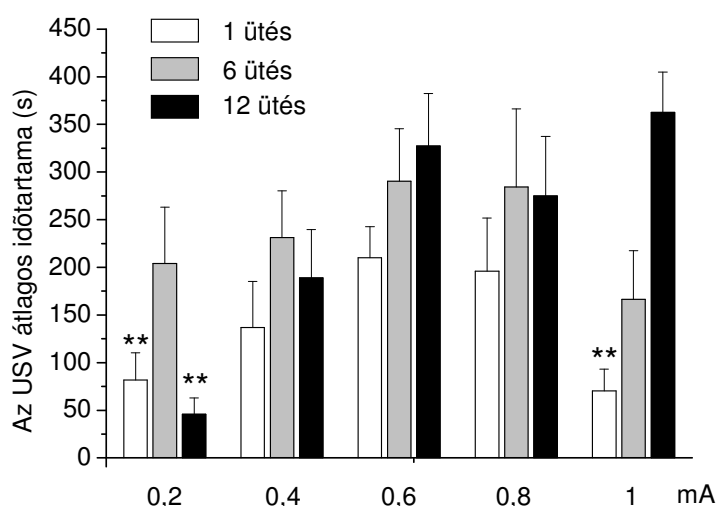
5.1. Az egyszeri és többszöri sokkolásos, valamint a sokkolási környezethez társítással USV modellek beállítása, összehasonlítása és alkalmazása

5.1.1. A megfelelő sokkolási erősség kiválasztása a három modellhez

A megfelelő sokkolási intenzitás kiválasztásához teszteltük a sokkok számának és áramerősségének USV-re gyakorolt hatását.

5.1.1.1. A sokkolás erősségének hatása az USV-re

Mind a sokkok száma [$F(2;166)=7,2$; $p<0,001$], mind az áramerősség [$F(4;166)=5,5$; $p<0,001$] szignifikáns hatást gyakorolt az USV intenzitására. A két paraméter interakciója szintén szignifikáns volt [$F(8;166)=2,3$; $p<0,05$]. Az 1 áramütésnek kitett csoportokban az USV átlagértékek haranggörbét mutattak az áramerősség függvényében. Ez a tendencia a 6 ütésnek kitett csoportoknál kevésbé volt hangsúlyos, míg a 12 ütésnek kitett csoportoknál már egyáltalán nem volt megfigyelhető (4. ábra).



4. ábra. A sokkok számának és az áram erősségének hatása az USV-re. N=12-13 csoportonként. A hibasávok a SEM-et jelzik (one-way ANOVA és Duncan post hoc teszt, ** $p<0.01$ a 0,6mA/6ütés csoporthoz viszonyítva).

5.1.1.2. Az eredmények értelmezése, és a megfelelő sokkolási erősség kiválasztása a további mérésekhez

Bár az 1 ütésnek kitett állatok USV átlaga haranggörbét adott az áramerősség függvényében, a csoportok közötti különbségek statisztikailag nem voltak szignifikánsak a 6 és 12 áramütésnek kitett csoportokat is magában foglaló ANOVA post hoc eredményei alapján. Mivel kevésbé hangsúlyosan, de a 6 áramütéssel sokkolt csoportok között is megfigyelhető ez a mintázat, feltehetően az átlagok alakulása egy valós, létező jelenséget mutat, nem pedig a csoportok átlagának random fluktuálása miatt alakult ki. Ez arra enged következtetni, hogy a túl magas intenzitású sokkolás hatására az állatok kevesebbet vokalizálnak. Ennek viszont ellentmond az, hogy a haranggörbe az áramütések számának növelésével eltűnik. A kérdés tisztázása további kísérleteket igényel.

Az eredmények alapján az egyszeri és többszöri sokkolásos elrendezéshez, valamint a sokkolási környezethez társított beállításhoz a 6 ütés/0,6 mA-es sokkolást választottuk. Az ettől erősebb sokkolásnak kitett csoportok közül egyedül a 12 ütés/6 mA-es és a 12 ütés/1 mA-es sokkolás esetében tapasztaltunk magasabb szintű átlagos vokalizációt, viszont az állatvédelmi szempontokat figyelembe véve a különbség mértéke nem indokolja ennek a sokkerősségnek az alkalmazását. Alacsonyabb sokkolási erősség esetén viszont féltő, hogy az alacsonyabb átlagértékek és az átlaghoz képest magasabb szórások miatt a kísérleteket nagyobb mintaelemszámmal kell elvégezni, ami nem csak a kísérletek költségét emeli, hanem állatvédelmi elvekkel is ütközik.

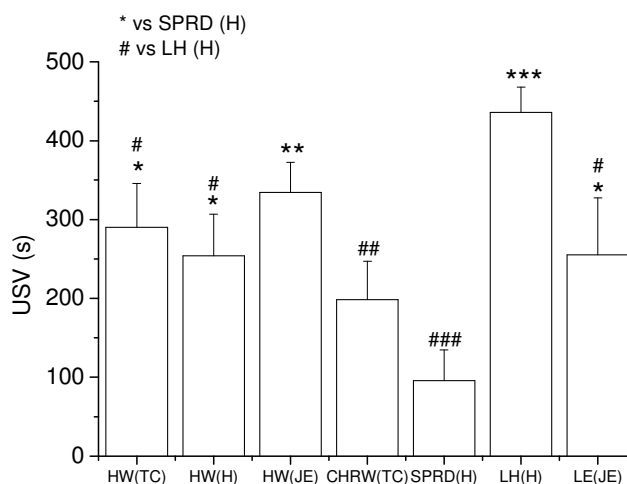
5.1.2 A különböző patkánytörzsek és beszállítók összehasonlítása az egyszeri sokkolásos USV paradigmában

A megfelelő törzs és beszállító kiválasztásához hét csoportot hasonlítottunk össze, melyekben az állatok különböző patkánytörzsbe tartoztak és/vagy más beszállítótól származtak.

5.1.2.1. Az összehasonlított törzsek USV szintje közötti különbségek

A vizsgált törzsek USV szintje szignifikánsan különbözött az egyszeri sokkolásos paradigmában [$F(6;77)=6,3$; $p<0.001$]. Legkevesebbet az SPRD (Harlan) csoport vokalizált, míg a legtöbbet vokalizáló a Lister Hooded (Harlan) csoport volt (5. ábra). A különböző beszállítóktól származó Hannover Wistarok közel hasonló szinten vokalizáltak, ezzel nagyjából megegyező szintet produkált a Long Evans (Harlan) is. A Charles River

Wistar (Toxicoop) átlaga alacsonyabb volt, mint a Hannover Wistaroké, de különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (5. ábra).



5. ábra. Törzsek és beszállítók összehasonlítása az egyszer sokkolt paradigmában. A hibásávok a SEM-et jelölik. N=12 csoportonként, kivéve Long Evans (Janvier) N=8; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ az SPRD (Harlan) csoporthoz viszonyítva, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ az Lister Hooded (Harlan) csoporthoz viszonyítva. HW(TC)= Hannover Wistar [HsdBrHan:Wistar] (Toxicoop), HW(H)= Hannover Wistar [HsdBrHan:Wistar] (Harlan), HW(JE)= Hannover Wistar [HsdBrHan:Wistar] (Janvier Elevage); CHRW(TC)= Charles River Wistar [CrI(W)Br] (Toxicoop), SPRD(H)= Sprague dawley [Hsd:SD(SPRD)] (Harlan), LH(H)= Lister Hooded [CrI:LIS] (Harlan), LE(JE)= Long evans [CrI:LE] (Janvier Elevage).

5.1.2.2. Az eredmények értelmezése, és a megfelelő törzs kiválasztása

Az eredmények jól demonstrálják, hogy a megfelelő törzs kiválasztása nem elhanyagolható szempont. Az SPRD patkányok vokalizáltak a legkevesebbet, ezt a törzset nem is gyakran használják USV kísérletekben, bár ellenpéldák is akadnak (Bartoszyk és mtsai, 1997; Jourdan és mtsai, 2002). A Lister Hooded patkányok vokalizáltak a legtöbbet. Érdekes módon egy másik szorongás paradigmában, az emelt keresztpalló tesztben a Lister Hooded törzsbe tartozó patkányok mutattak kevésbé szorongó fenotípust az SPRD és Charles River Wistar patkányokhoz képest (McDermott és Kelly, 2008). Szemben az áramütés kiváltotta USV modellel, ebben a tesztben a szorongásos viselkedést nem egy kellemetlen behatással váltják ki, hanem itt a szorongás mértékét az állatok a keresztpalló biztonságos zárt, és kevésbé biztonságos nyílt kari tartózkodásának aránya mutatja meg. A Lister Hooded törzsbe tartozó patkányokból nagy erősségű hangokkal mozgási kitörések válthatók ki. Ennek alapján elképzelhető, hogy bár a Lister Hooded patkányok szorongás szintje alapján véve nem magasabb, de kifejezetten érzékeny reagálnak kellemetlen

behatásokra, mint például az áramütések, és ez eredményezte a magasabb szorongás szintet az USV tesztben.

Azon kívül, hogy a törzsválasztás befolyásolhatja az eredményeket, azt is figyelembe kell venni, hogy egy adott törzs esetében hány állatot kell felhasználni egy csoportban, illetve azok mennyire könnyen beszerezhetőek és mennyibe kerülnek.

Az egyszeri sokkolásos USV paradigmában a Lister Hooded patkányok erősen szorongásos fenotípust mutattak. Így a fentieknek alapján ez a törzs tűnik a legmegfelelőbbnek, viszont hasonlóan a Long Evans törzshöz, ezek az állatok jóval drágábban beszerezhetőek.

Az SPRD törzs esetében a várható mintaelemszám jelenthet hátrányt. Az emelt keresztpalló tesztben a diazepám nem mutatott szorongásoldó hatást az abban a paradigmában kevésbé szorongó fenotípust mutató Lister Hooded törzsben, míg a paradigmában szorongóbb SPRD törzs esetében a diazepám szignifikánsan növelte a nyílt kari bemenetek számát (McDermott és Kelly, 2008). Ennek analógiájára feltételezhető, hogy az USV tesztben kevésbé szorongó fenotípust mutató SPRD patkányokon tesztelendő vegyületek szorongásoldó hatása is nehezebben, nagyobb mintaelem számokkal lenne kimutatható.

Mindezen megfontolások alapján a vizsgálataink elvégzéséhez a Hannover Wistar törzset választottuk.

Mivel a három szállítótól származó Hannover Wistar csoportok között nem találtunk különbséget, megállapítható, hogy szemben a törzsek közötti különbségekkel, a tenyésztési és szállítási körülmények nem befolyásolják jelentős mértékben az árammal kiváltott vokalizációk szintjét. A kísérleteikben a Harlan-tól beszerezett állatokat használtunk.

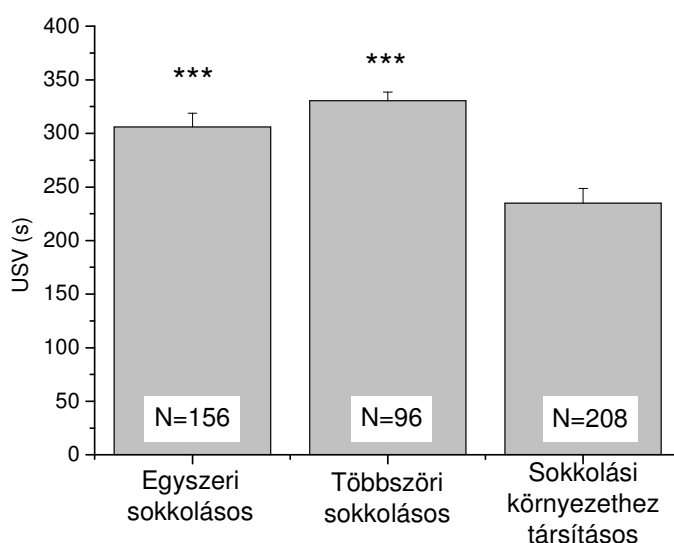
5.1.2. Az egyszeri- és a többszöri sokkolásos, valamint a sokkolási környezethez társításos paradigmák összehasonlítása

A megfelelő szűrési módszer kiválasztásához összehasonlítottuk négy SSRI, a fluoxetin, szertralin, paroxetin és escitaloprám, valamint a 8-OH-DPAT és az alprazolám hatását a három tesztprotokollban.

Az anyaghatások tesztelése mellett vizsgáltuk a kontroll csoportok vokalizációs szintje közötti különbségeket is.

5.1.2.1. A kontroll csoportok USV intenzitása a három teszt paradigmában

A három sokkolási paradigma kontrolljának USV szintje szignifikánsan különbözött [$F(2;465)=15,8$; $p<0,001$]. A sokkolási környezethez társításos paradigmában a kontroll állatok kevesebbet vokalizáltak az expressziós napon, amikor az állatok nem kaptak sokkot, mint az egyszeri és többszöri sokkolásos beállítás kontrolljai, amelyeknél az USV-t közvetlenül a sokkolás után mértük. Az egyszeri és többször sokkolásos beállítás kontrolljai között nem volt szignifikáns különbség (6. ábra).

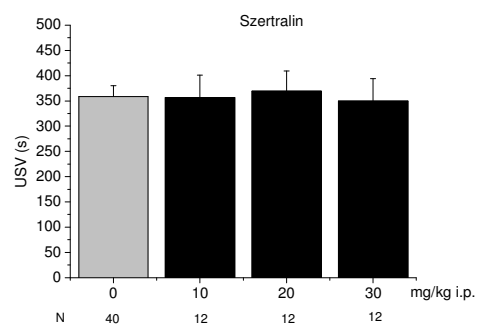
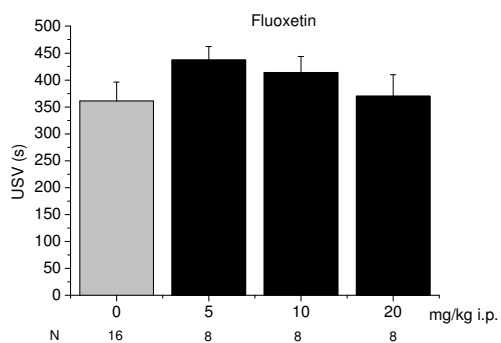


6. ábra. A kontroll csoportok vokalizációjának átlagos időtartama a három sokkolási protokollban. A hibásávok a SEM-et az N-ek a csoportonkénti elemszámot jelölik. (one-way ANOVA és Duncan post hoc teszt, *** $p<0,001$)

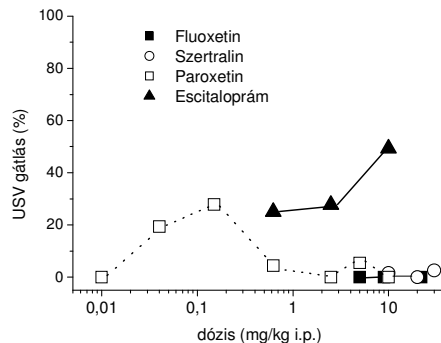
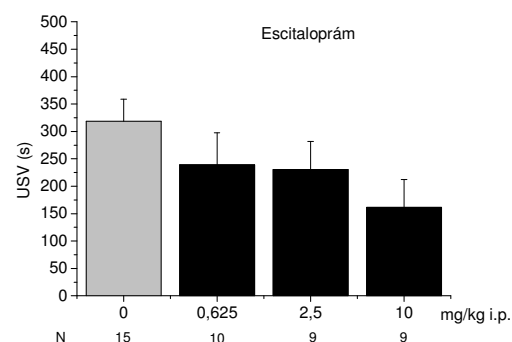
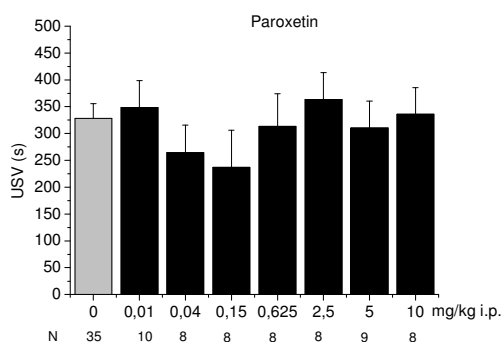
5.1.2.2. Az SSRI-k, az alprazolám és a 8-OH-DPAT hatása az egyszeri sokkolásos protokollban

A négy SSRI közül az egyszeri sokkolásos protokollban a fluoxetin [$F(3;36)=0,99$; $p=0,40$] és a szertralin [$F(3;72)=0,04$; $p=0,98$] teljesen hatástalan volt. A paroxetin harang alakú dózis-hatás görbét produkált, de a maximális hatása alacsony volt és nem különbözött statisztikailag szignifikánsan a kontrolltól [$F(7;86)=0,35$; $p=0,92$] (7. ábra). Az escitaloprám egy USV csökkentő trendet mutatott, de maximális hatása 50% alatt volt és szintén nem különbözött statisztikailag szignifikánsan a kontrolltól [$F(3;39)=1,9$; $p=0,15$].

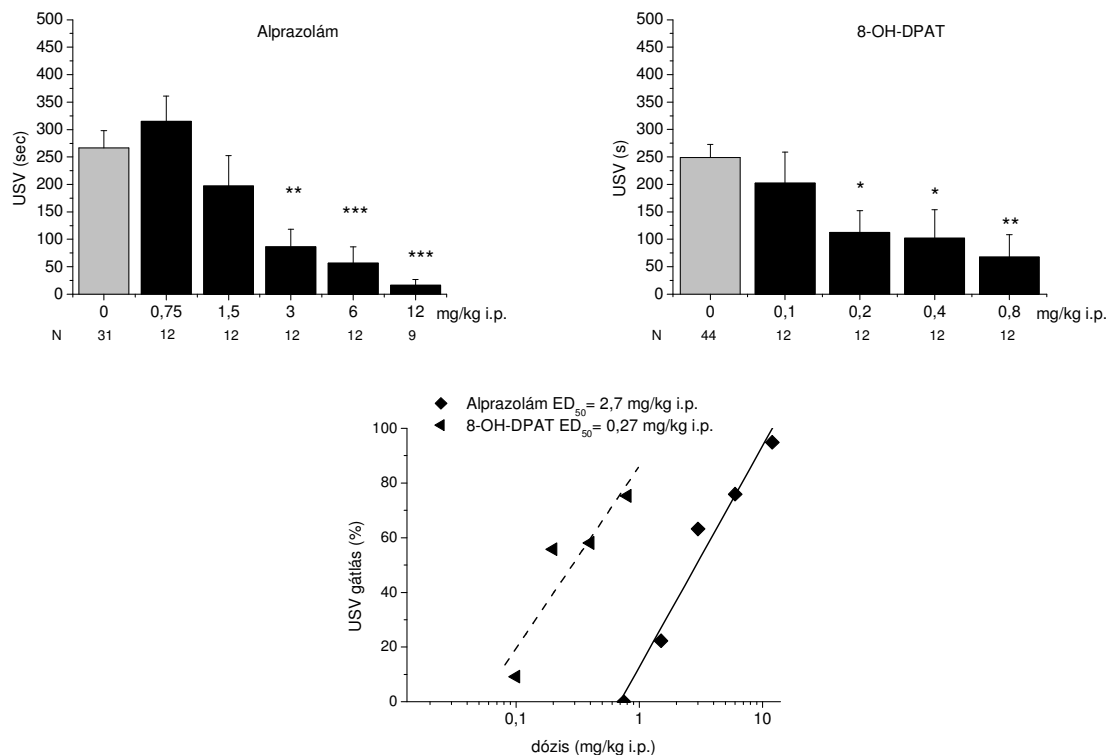
Mind az alprazolám [$F(5;82)=8,7$; $p<0,001$], mind a 8-OH-DPAT [$F(4;87)=4,7$; $p<0,01$] szignifikánsan csökkentette az USV-t, mindkét anyag dózis-hatás görbéje lineáris volt, sorrendben 2,7 és 0,27 mg/kg ED_{50} értékkel (8. ábra).



11



7. ábra. Az SSRI-k hatása az egyszeri sokkolásos protokollban. Az oszlopdiagramok az USV átlagos időtartamát mutatják. A szürke oszlopok a kontroll csoportot, a fekete oszlopok a kezelt csoportokat jelölik. A hibásávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A legelső diagramon a százalékos USV gátlások alapján ábrázolt dózis-hatás görbék láthatók. A görbék alapján ED_{50} értékeket nem lehetett meghatározni.

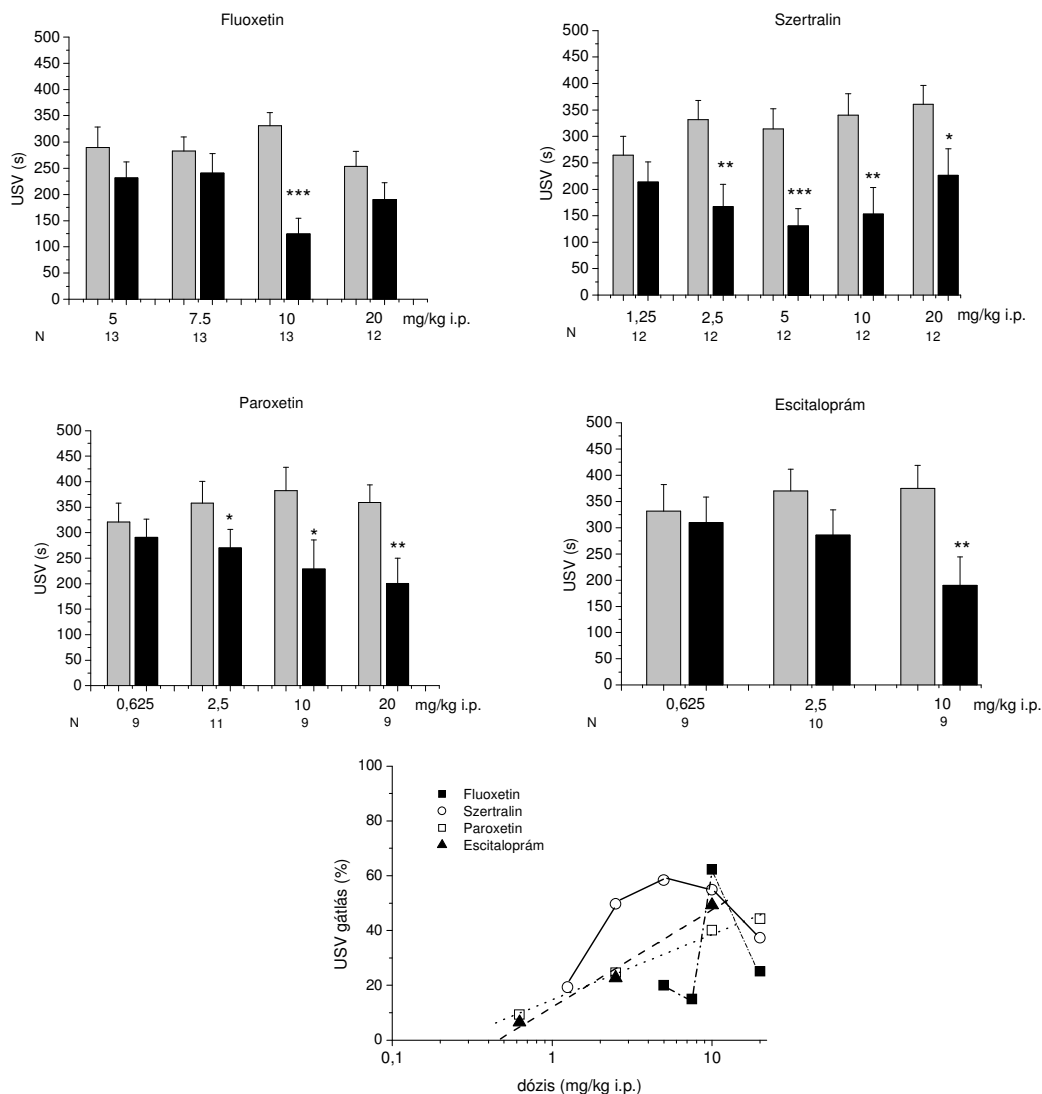


8. ábra. Az alprazolám és a 8-OH-DPAT hatása az egyszeri sokkolásos protokollban. Az oszlopdiagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlopok a kontroll csoportot, a fekete oszlopok a kezelt csoportokat jelölik. A hibasávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns különbségeket jelölik (one-way ANOVA, Dunnett post hoc * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). A pontdiagramon a százalékos USV gátlásokat, valamint a lineáris regresszióval meghatározott dózis-hatás görbéket ábrázoltuk.

5.1.2.3. Az SSRI-k, az alprazolám és a 8-OH-DPAT hatása a többszöri sokkolásos protokollban

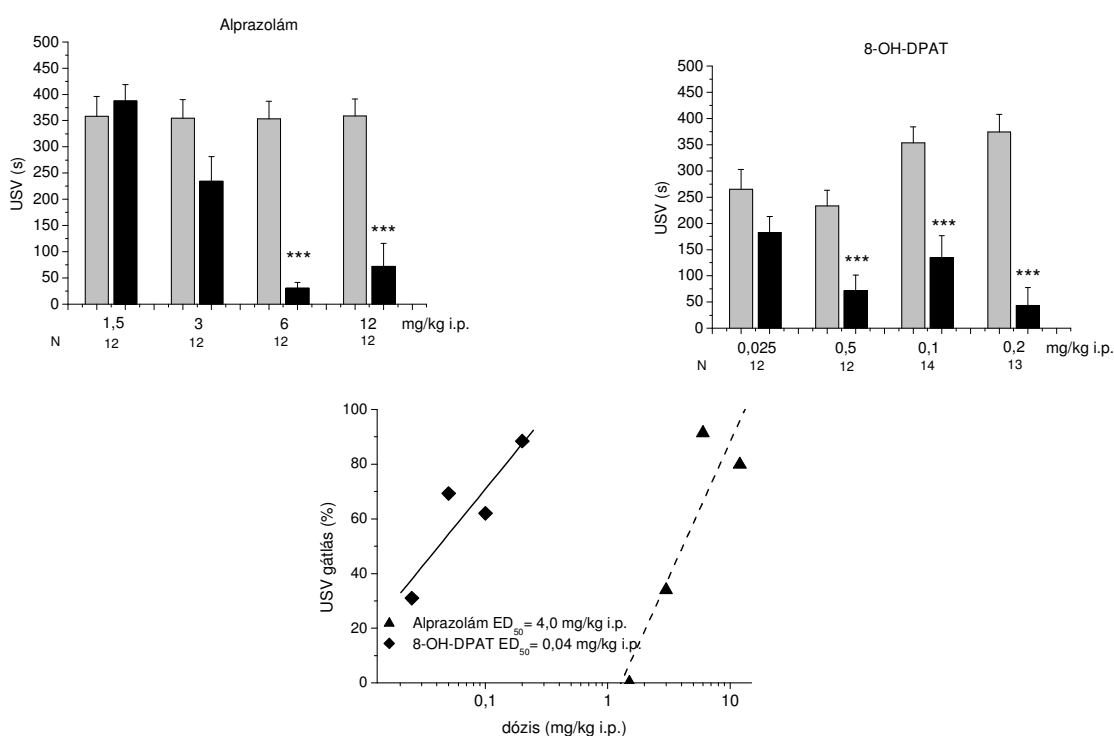
Az egyszeri sokkolásos protokollal szemben a többszöri sokkolásos elrendezésben az SSRI-k csökkentették az USV-t (9. ábra). A fluoxetin és a szertralín dózis-hatás görbéje harang alakú volt (9. ábra). A fluoxetin USV gátlása csak a 10 mg/kg-os dózisinál volt szignifikáns ($t=7,7$; $df=12$; $p<0,001$), az ettől alacsonyabb, illetve az ettől magasabb dózisokban az anyag nem volt hatékony. A szertralín 2,5 mg/kg-tól 20 mg/kg-ig mutatott szignifikáns hatást (2,5 mg/kg: $t=4,4$; $df=11$; $p<0,01$; 5 mg/kg: $t=6,2$; $df=11$; $p<0,01$; 10mg/kg: $t=4,7$; $df=11$; $p<0,01$; 20 mg/kg: $t=2,8$; $df=11$; $p<0,05$). Ellentétben a fluoxetintől és a szertralintól, a paroxetin és az escitaloprám dózis-hatás görbéje lineáris volt, de mindkét anyag maximális hatása 50% alatt maradt (9. ábra). A paroxetin 2,5 mg/kg-tól csökkentette szignifikánsan az USV-t (2,5 mg/kg: $t=2,8$; $df=10$; $p<0,05$; 10mg/kg: $t=3,7$; $df=8$; $p<0,05$;

20 mg/kg: $t=4,4$; $df=8$; $p<0,01$), míg az escitaloprám csupán a 10 mg/kg-os dózisban volt szignifikánsan hatékony ($t=5,3$; $df=8$; $p<0,01$).



9. ábra. Az SSRI-k hatása a többszöri sokkolásos protokollban. Az oszlopdiagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlopok a kontroll napot, a fekete oszlopok a kezelési napot jelölik. A hibasávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok az adott kontroll naptól való szignifikáns különbségeket jelölik (t-test Holm korrekcióval, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). A legalsó diagramon a százalékos USV gátlásokat ábrázoltuk. A dózis-hatás görbék alapján nem lehetett ED_{50} értékeket meghatározni.

Hasonlóan az egyszeri sokkolásos protokollhoz, az alprazolám és a 8-OH-DPAT dózis-hatás görbéje a többszöri sokkolásos elrendezésben is lineáris volt (10. ábra). Az alprazolám 6 mg/kg-tól (6 mg/kg: $t=10,5$; $df=11$; $p<0,001$; 12 mg/kg: $t=6,9$; $df=11$; $p<0,001$), a 8-OH-DPAT 0,025 mg/kg-tól (0,025 mg/kg: $t=3,2$; $df=11$; $p<0,01$; 0,5 mg/kg: $t=7,7$; $df=11$; $p<0,001$; 0,1 mg/kg: $t=5,1$; $df=11$; $p<0,001$; 0,2 mg/kg: $t=9,1$; $df=12$; $p<0,001$) gátolta szignifikánsan az USV-t. A regresszió alapján az alprazolám ED_{50} értéke 4,0 mg/kg, a 8-OH-DPAT ED_{50} értéke 0,04 mg/kg volt.



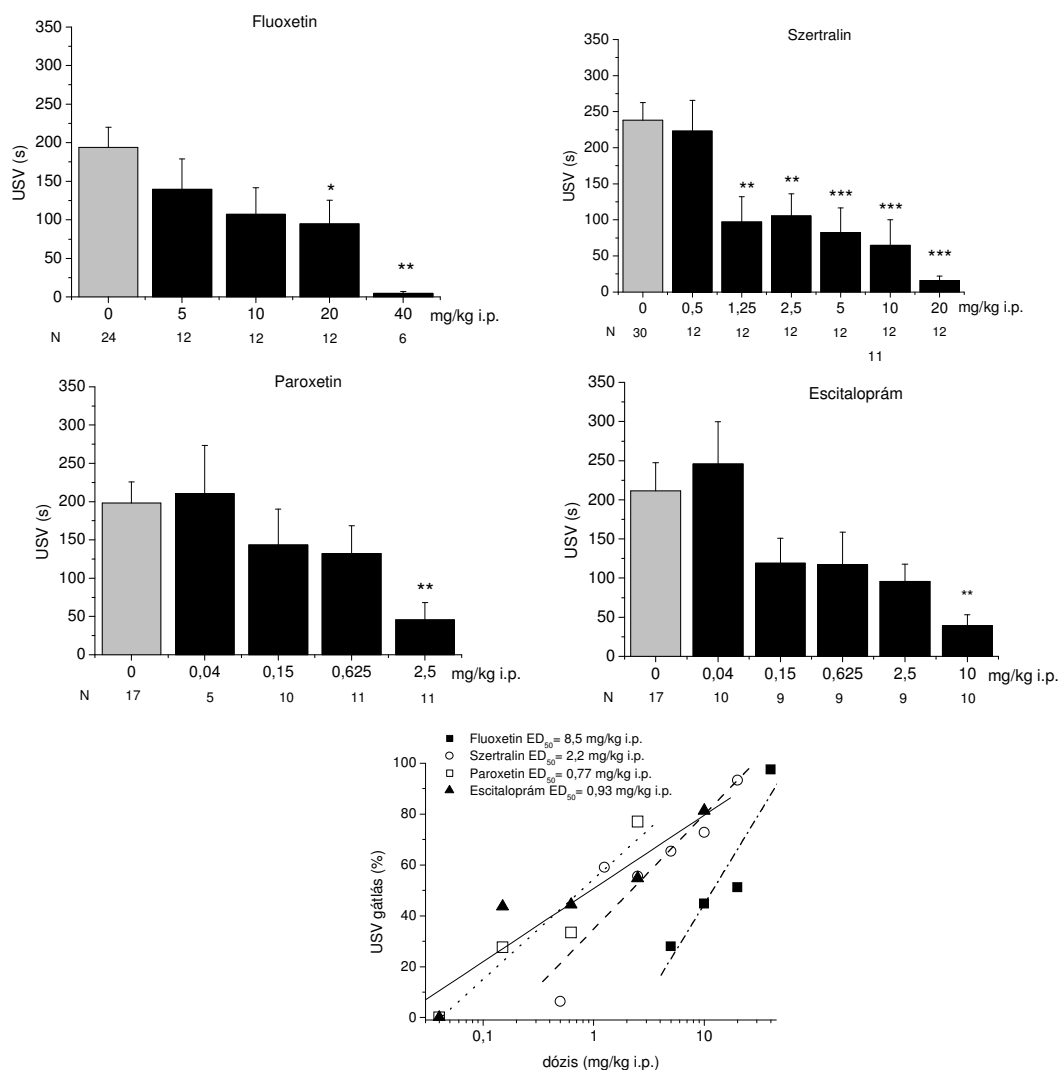
10. ábra. Az alprazolám és a 8-OH-DPAT hatása a többszöri sokkolásos protokollban. Az oszlopdiaagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlopok a kontroll napot, a fekete oszlopok a kezelési napot jelölik. A hibásávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok az adott kontroll naptól való szignifikáns különbségeket jelölik (t-test Holm korrekcióval, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Az alsó diagramon a százalékos USV gátlások, és a lineáris regresszióval meghatározott dózis-hatás görbék láthatók.

5.1.2.4. Az SSRI-k, az alprazolám és a 8-OH-DPAT hatása a sokkolási környezethez társításos protokollban

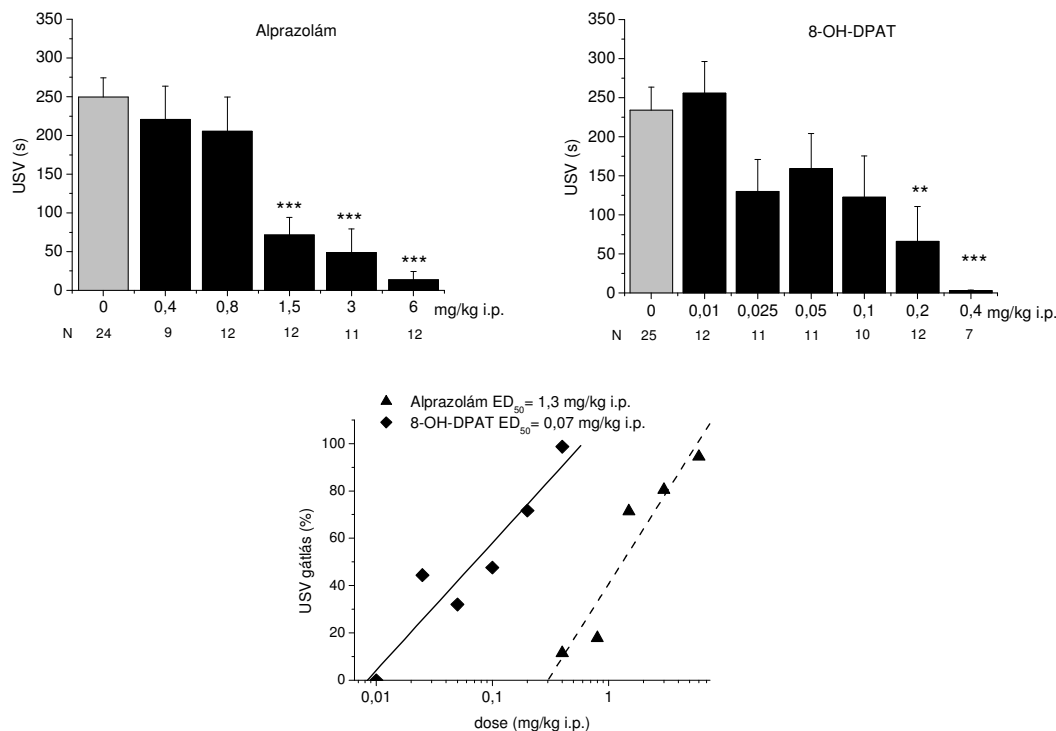
A sokkolási környezethez társításos protokollban mind a négy vizsgált SSRI szignifikánsan csökkentette az USV-t, és mind a négy anyag lineáris dózis-hatás görbét mutatott [Fluoxetin: $F(4;60)=3,7$; $p<0,01$; $ED_{50}= 8,5$ mg/kg; Szertralin: $F(6;95)=8,1$;

$p < 0,001$; $ED_{50} = 2,2$ mg/kg; Paroxetin: $F(4;49)=3,2$; $p < 0,05$; $ED_{50} = 0,77$ mg/kg; Escitaloprárm: $F(5;58)=4,3$; $p < 0,01$; $ED_{50} = 0,93$ mg/kg] (11. ábra).

Hasonlóan az egyszeri és többszöri sokkolásos paradigmában mutatott hatásához, az alprazolám [$F(5;74)=11,7$; $p < 0,001$] és a 8-OH-DPAT [$F(6;81)=4,5$; $p < 0,001$] ebben a paradigmában is szignifikánsan csökkentette az USV-t (12. ábra). Mindkét anyag lineáris dózis-hatás görbét mutatott az alprazolám esetében 1,3 mg/kg-os, a 8-OH-DPAT esetében pedig 0,07 mg/kg-os ED_{50} értékekkel.



11. ábra. Az SSRI-k hatása a sokkolási környezethez társított protokollban. Az oszlopdiagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlopok a kontroll csoportot a fekete oszlopok a kezelt csoportokat jelölik. Hibásávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns különbségeket jelölik (one-way ANOVA, Dunnett post hoc * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). A legalsó diagramon a százalékos USV gátlások és a lineáris regresszióval meghatározott dózis-hatás görbéket ábrázoltuk.



12. ábra. Az alprazolám és a 8-OH-DPAT hatása a sokkolási környezethez társított protokollban. Az oszlopdiagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlopok a kontroll csoportot, a fekete oszlopok a kezelt csoportokat jelölik. A hibasávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok kontrolltól való szignifikáns különbségeket jelölik ((one-way ANOVA, Dunnett post hoc $**p < 0,01$, $***p < 0,001$). Az alsó diagramon a százalékos USV gátlások és a lineáris regresszióval meghatározott dózis-hatás görbéket ábrázoltuk.

5.1.2.5. A három teszt protokoll összehasonlítása az eredmények alapján

Az akutan adagolt SSRI-k hatása erősen függ az alkalmazott teszt-protokolltól. Az egyszeri sokkolásos paradigmában, ahol az állatok csak egyszer, a teszt napon voltak kitéve az áramütéseknek, az SSRI-k hatástalannak bizonyultak. Ezzel szemben a sokkolási környezethez társításos protokollban, ahol az állatok a mérést megelőző tréning napokon voltak kitéve a sokkolásnak, mindegyik SSRI csökkentette az USV-t, és lineáris dózis-hatás görbét mutatott. A többszöri sokkolásos paradigmában, ahol az állatok a tesztenapon, és az azt megelőző tréning napon is kaptak sokkot, az SSRI-k átmeneti hatást mutattak. Maximális USV gátlásuk az egyszeri sokkolásos és a sokkolási környezethez társításos elrendezésekben mutatott értékek között mozgott. A fluoxetin és a szertralin dózis-hatás görbéje harang alakú volt, míg a paroxetin és az escitaloprám lineáris dózis-hatás görbét mutatott.

Szemben az SSRI-kel, az alprazolám hatása mindhárom protokollal hasonló volt. A dózis-hatás görbék minden esetben lineárisak voltak, és az USV gátlás hatékonysága szintén közel egyforma volt a számított ED₅₀ értékek alapján. A 8-OH-DPAT dózis-hatás görbéje is lineáris volt mindhárom teszt beállításánál, de ez a vegyület kevésbé hatékonyan és kisebb potenciállal gátolta az USV-t az egyszeri sokkolásos protokollban.

A korábban közölt tanulmányokban az akutan adott SSRI-k felnőtt patkányok USV-jére gyakorolt hatását szinte kizárólag csak többszöri sokkolásos elrendezésekben tesztelték. A közölt eredmények nem teljesen egybehangzóak. Hasonlóan a mi eredményeinkhez, a De Vry és mtsai (1993) és a Sanchez (1993) féle többszöri sokkolásos protokollban a fluoxetin és a szertralin csupán parciálisan gátolta az USV-t (De Vry és mtsai, 1993; Sanchez and Meier, 1997; Schreiber és mtsai, 1998; De Vry és mtsai, 2004). Ezzel szemben a fluoxetin hatástalan volt egy másik többszöri sokkolásos elrendezésben (Bartoszyk és mtsai, 1997). Szemben a mi eredményeinkkel, a paroxetin, noha változó potenciállal, de több vizsgálatban is teljes mértékben gátolta az USV-t (Sanchez and Meier, 1997; Schreiber és mtsai, 1998; Sanchez, 2003b), valamint az escitaloprám is teljes mértékű gátlást mutatott (Sanchez, 2003a; Sanchez és mtsai, 2003). A citaloprám dózis-hatás görbéje harang alakú volt a Sanchez (1993) féle protokollban (Sanchez és mtsai, 2003), míg lineáris volt a De Vry és mtsai (1993) féle protokollban. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az akutan adagolt SSRI-k hatásprofilja érzékeny az adott többszöri sokkolásos teszt-paradigma beállításaira.

Az irodalmi adatok alapján, az SSRI-k közül korábban kizárólag a fluvoxamint vizsgálták meg a sokkolási környezethez társított USV teszt paradigmában (Molewijk és mtsai, 1995). Ebben a tanulmányban, – ahogy a többi SSRI a mi kísérleteinkben –, a fluvoxamin hatékonyan gátolta az USV-t, és a dózis-hatás görbéje lineáris volt. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a sokkolási környezethez társításos elrendezés érzékenyebben detektálja az SSRI-k USV csökkentő hatását.

A 8-OH-DPAT mind a saját, mind az irodalomban közölt vizsgálatokban hatékonyan gátolta az USV-t a többszöri sokkolásos paradigmában (De Vry és mtsai, 1993; Sanchez, 1993; Jolas és mtsai, 1995; Bartoszyk és mtsai, 1997; Sanchez and Mork, 1999; Bartoszyk és mtsai, 2004), valamint a sokkolási környezethez társításos paradigmában (Molewijk és mtsai, 1995). Az alprazolámot mindeztáig csak sokkolási környezethez társított USV tesztben vizsgálták, ahol hasonló hatást mutatott (Molewijk és mtsai, 1995), mint a mi sokkolási környezethez társított USV protokollunkban.

Felmerül a kérdés, hogy az SSRI-k vajon miért mutattak ilyen jelentős mértékben különböző karakterisztikát a három USV protokollban. A környezethez társításos elrendezésben a patkányok kevesebbet vokalizáltak, mint az egyszeri és a többszöri sokkolásos paradigmákban, ami bizonyos mértékig nem meglepő, hiszen egy társításos elrendezésben adott válasz várhatóan nem lesz olyan erős, mint akut ingerlés után. Így felvetődik annak lehetősége, hogy az SSRI-k a környezethez társításos paradigmában azért bizonyulnak hatékonyabbnak, mert a gyengébb válasz könnyebben gátolható. Bár nem lehet kizárni, hogy az alacsonyabb USV szint hozzájárult az SSRI-k környezethez társításos protokollban mutatott nagyobb hatékonyságukhoz, de eltérő karakterisztikájuk a három teszt protokollban ezzel önmagában nem magyarázható. Egyrészt, bár a kontrollesoportok közötti különbség szignifikáns volt, a különbség mértéke az átlagok között nem volt számottevő, ezért nem tűnik valószínűnek, hogy ez ilyen jelentős különbséget okozott volna az SSRI-k hatásában. Továbbá, amennyiben kizárólag az USV intenzitása miatt alakultak volna ki a különbségek, akkor az SSRI-k karakterisztikájának hasonlóknak kellett volna lenni az egyszeri és a többszöri sokkolásos paradigmában, mivel azok kontrollértékei között nem volt szignifikáns különbség. Harmadrészt, ha az SSRI-k hatása az alacsonyabb USV szint miatt lett volna magasabb a sokkolási környezethez társításos paradigmában, akkor az alprazolámnak és a 8-OH-DPAT-nek is hatékonyabbnak és/vagy potensebbnek kellett volna lennie ebben a beállításban. Ezzel szemben az alprazolám hasonló hatást mutatott mindhárom protokollban, míg a 8-OH-DPAT hasonló hatást mutatott a többszöri sokkolásos és a sokkolási környezethez társított USV beállításokban. Tehát az SSRI-k különböző karakterisztikája a három paradigmában más okokra vezethető vissza.

Mind a többszöri sokkolásos, mind a sokkolási környezethez társításos USV paradigmában kialakított szorongási állapotnak memória komponense is van a tesztek előtt alkalmazott tréning miatt. Ez egy jelentős különbség az egyszeri sokkolásos teszt protokollal szemben. Így felmerül annak lehetősége, hogy ez az oka annak, hogy az SSRI-k különböző szorongásoldó profilt mutattak az egyes paradigmákban. Több irodalomban leközölt tanulmány eredménye azt mutatja, hogy az önmagukban adagolt SSRI-k rontották a memória akvizícióját, amikor adagolásuk a tesztek tréning fázisa előtt történt, míg javították a memória konszolidációt, amikor a tréning után adagolták azokat (összefoglaló cikk: Monleon és mtsai, 2008). Továbbá egy vizsgálatban kimutatták a citaloprám képes visszafordítani a szkopolamin és a tetrahidrokannabinol térbeli memóriára gyakorolt rontó hatását a sugárlabirintus tesztben (Egashira és mtsai, 2006). A

mi vizsgálatainkban is az SSRI-k esetleges memória hatása kizárólag az előhívási fázisra korlátozódhat, mivel az anyagadások az expressziós próba előtt történtek. Ennek alapján valószínűtlennek tűnik, hogy az SSRI-k USV gátló hatása a többszöri sokkolásos és a sokkolási környezethez társításos paradigmákban annak lenne betudható, hogy gátolták volna a memória előhívását. Továbbá, az alprazolám, mely vegyületnek memóriarontó hatását több vizsgálatban is igazolták (Hogan és mtsai, 2005; Bertaina-Anglade és mtsai, 2009), mindhárom USV protokollban hasonló hatékonyságot mutatott. Ezért valószínűsíthető, hogy az SSRI-k magasabb hatékonysága a többszöri sokkolásos és a sokkolási környezethez társításos paradigmákban nem memóriarontó hatás eredménye.

Az eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a tesztet megelőző sokkolás elengedhetetlen ahhoz, hogy az SSRI-k akut adagolást követően szorongásoldó hatást mutassanak. Ez a feltevés összhangban van a preklinikai irodalommal. Az akutan adagolt SSRI-k olyan tesztekben mutattak szorongásoldó hatást, melyekben az anyagok tesztelését megelőzően az állatokat kitették a szorongást kiváltó stresszornak. Ilyen modellek a felnőtt patkányok USV gátlásán alapuló többszöri sokkolásos és a környezethez vagy kulcsingerhez társításos USV paradigmák (De Vry és mtsai, 1993; Sanchez and Meier, 1997; Sanchez, 2003a és 2003b; Sanchez és mtsai, 2003), újszülött patkányok USV gátlása (De Vry és mtsai, 2004; Starr és mtsai, 2007; Hodgson és mtsai, 2008), valamint a félelmi kondicionálás expressziója (Gravius és mtsai, 2006; Nishikawa és mtsai, 2007; Muraki és mtsai, 2008). Ezzel szemben azokban a modellekben, amelyekben a tesztet megelőzően nem volt stressz expozíció, mint például az emelt keresztpalló tesztben és a szociális interakció tesztben, az akutan adagolt SSRI-k anxiogén (Dekeyne és mtsai, 2000; Silva and Brandao, 2000; Bagdy és mtsai, 2001; Andó és mtsai, 2010), vagy inkonzisztens, vegyes szorongás keltő/oldó hatást mutattak, mint a fekete-fehér doboz teszt esetében (Sanchez és Meier, 1997; Sanchez és mtsai, 2003). A stressz számos változást indukál a szerotonerg rendszerben (Stark és Scheich, 1997; Lopez és mtsai, 1999; Pawlak és mtsai, 2000; Izumi és mtsai, 2002; Dazzi és mtsai, 2005; Hale és mtsai, 2011). Feltehetően a stressz indukálta szerotonerg változások felelősek az SSRI-k magasabb hatékonyságáért azokban a modellekben, melyeknek stressz preexpozíciós fázisuk is van. Ezt a hipotézist erősíti meg az is, hogy az 5HT_{1A} receptor agonista 8-OH-DPAT a többszöri sokkolásos és a környezethez kondicionált paradigmában hatékonyabb volt, míg a nem szerotonerg rendszeren keresztül ható alprazolám karakterisztikája nem mutatott számottevő különbséget az egyes teszt protokollokban.

Az eltérő elősokkolások miatt három paradigmában a szorongásos viselkedés más-más aspektusa jelenik meg, és feltehetően ez is szerepet játszik az SSRI-k paradigmánként eltérő hatásprofiljában. Az egyszeri sokkolásos elrendezésben a sokkolás bekövetkezése, míg a környezethez társításos elrendezésben a sokkolás bekövetkezésének a lehetősége váltja ki az USV-t. Ennek megfelelően az egyszeri sokkolásos paradigmában kiváltott USV egy akut félelmi reakció lehet, míg a környezethez társításos paradigmában anticipációs félelmet tükrözhet. A többszöri sokkolásos elrendezésben pedig mindkét típusú reakció jelen lehet. Amennyiben, szemben az alprazolámmal és a 8-OH-DPAT-tel, az SSRI-k csupán az anticipátoros félelmet képesek csökkenteni, az akut félelmet viszont nem, akkor ezzel az SSRI-k három paradigmában mutatott eltérő hatása magyarázható lehet, viszont mindez nem ad választ arra, hogy szemben a klinikai tapasztalatokkal, a szorongásoldó hatás miért jelentkezik már akut adagolás után is. Ez utóbbi kérdés megválaszolásához közelebb vihet az SSRI-k hatásának krónikus adagolás után történő vizsgálata a három modellben.

Összegezve megállapítható, hogy a három kísérleti elrendezés tulajdonképpen három különböző szorongásmodellnek tekinthető, melyek eltérő hasonlósági, konstruktív, és ebből következően eltérő prediktív validitással bírnak. Szemben az alprazolámmal, az SSRI-k és a 8-OH-DPAT nagyobb hatékonyságot mutatott a többszöri sokkolásos és a sokkolási környezethez társításos protokollal, mint az egyszeri sokkolásos paradigmában, mely utóbbian az állatok nem voltak kitéve sokkolásnak a tesztet megelőzően.. A modellenként eltérő hatások magyarázata lehet egyrészt az, hogy három paradigmában a szorongásos viselkedés más-más aspektusa jelenik meg, másrészt az, hogy az elősokkolások bizonyos változásokat indukálnak a szerotonerg rendszer működésében.

5.1.2.6. A szűrésre legalkalmasabb tesztprotokoll kiválasztása

Tesztelési kapacitás szempontjából az egyszeri sokkolásos elrendezés a legelőnyösebb, viszont ebben a kísérleti protokollban az SSRI-k nem voltak hatékonyak.

Szemben a másik két paradigmával, a sokkolási környezethez társításos elrendezésben minden tesztelt vegyület hatékornak bizonyult, és lineáris dózis-hatás görbét produkált, így anyaghatások tekintetében ez az elrendezés a legoptimálisabb. Azonban a módszer tesztelési sebessége jóval alacsonyabb az egyszeri és többszöri sokkolásos elrendezéshez képest, mivel egy mérés három napig tart, így egy munkahéten mindössze egy tesztelés végezhető el.

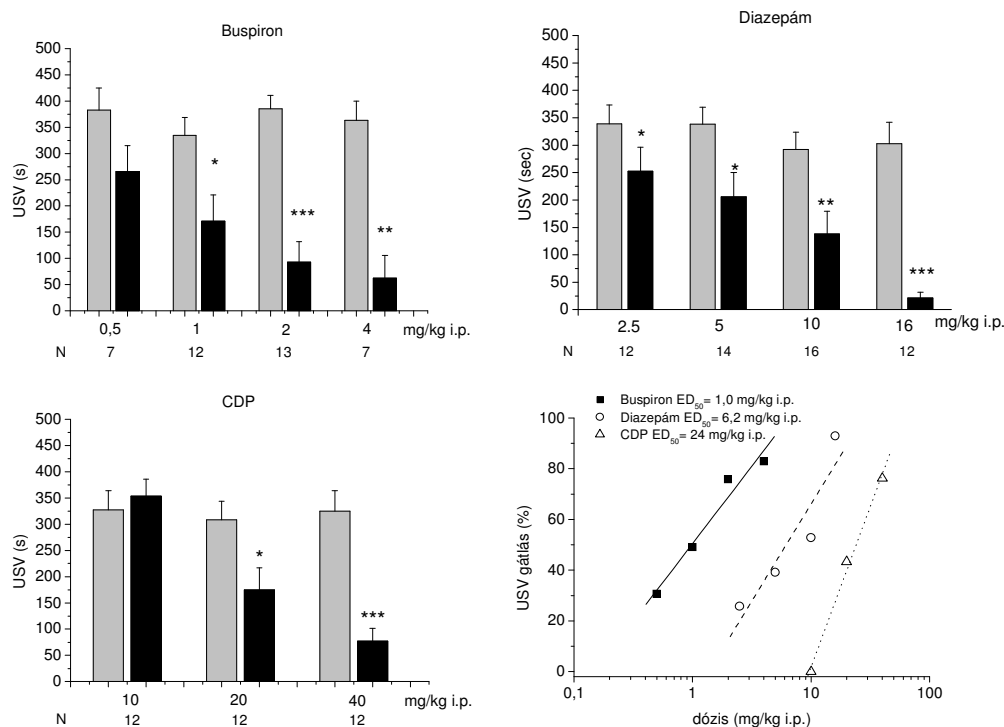
A többszöri sokkolásos elrendezésben minden referens anyag szignifikáns hatást mutatott, bár itt az SSRI-k hatékonysága a sokkolási környezethez társításos elrendezéshez képest alacsonyabb volt. A módszer mérési kapacitása, bár elmarad az egyszeri sokkolásos paradigmától, megfelelő tesztelési sebességet biztosít. Nagy előnye az önkontrollos elrendezés, valamint az, hogy a kísérletbe bevont állatok többször is használhatóak tesztelésre, ami mind költséghatékonysági mind állatvédelmi szempontból kedvező. Ennek megfelelően a többszöri sokkolásos elrendezést választottuk szűrő módszernek.

5.1.3. A többszöri sokkolásos modell szűrő módszerként történő alkalmazása

A többszöri sokkolásos elrendezésben a diazepam, a CDP és a buspiron mellett olyan vegyületeket teszteltünk, melyeket az irodalmi adatok alapján korábban még nem vizsgáltak ebben a módszerben.

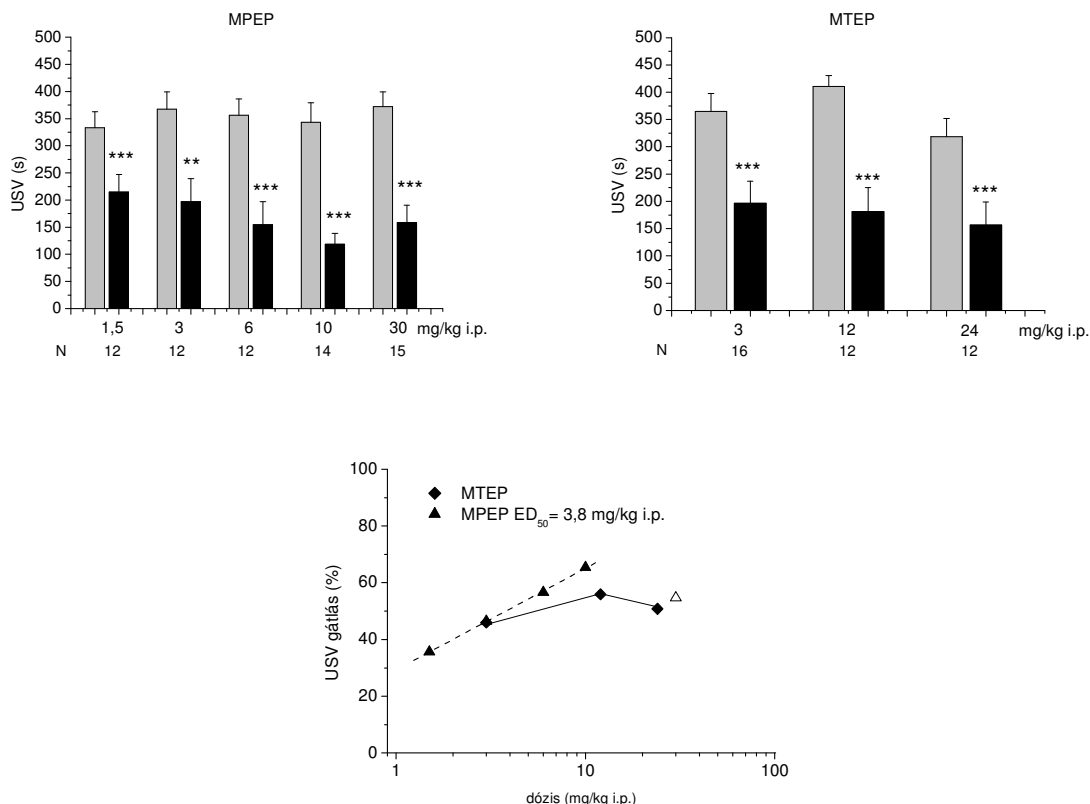
5.1.3.1 A diazepam, a CDP, a buspiron, valamint az mGlu₅, 5-HT_{2C} és 5-HT_{5A} receptor antagonisták hatása

Mind a buspiron, mind a diazepam és a CDP szignifikánsan gátolta az USV-t a többszöri sokkolásos protokollban (13. ábra). A buspiron 1 mg/kg-tól (1 mg/kg: $t=3,9$; $df=11$; $p<0,05$; 2 mg/kg: $t=7,2$; $df=11$; $p<0,001$; 4 mg/kg: $t=6,2$; $df=6$; $p<0,01$), a diazepam 2,5 mg/kg-tól (2,5 mg/kg: $t=3,0$; $df=11$; $p<0,05$; 5 mg/kg: $t=2,8$; $df=11$; $p<0,05$; 10 mg/kg: $t=3,4$; $df=6$; $p<0,01$; 16 mg/kg: $t=7,6$; $df=11$; $p<0,001$), a CDP 20 mg/kg-tól (20 mg/kg: $t=3,3$; $df=11$; $p<0,05$; 40 mg/kg: $t=6,4$; $df=11$; $p<0,001$) volt hatékony, rendre 1,0, 6,2 és 24 mg/kg-os ED₅₀ értékekkel.



13. ábra. A buspiron, a diazepam és a CDP hatása a többszöri sokkolásos USV modellben. Az oszlopdiagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlopok a kontroll napot, a fekete oszlopok a kezelési napot jelölik. A hibásávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok kontrolltól való szignifikáns különbségeket jelölik (t-teszt Holm korrekcióval, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). A pontdiagramon a három anyag százalékos USV gátlását és a lineáris regresszióval meghatározott dózis-hatás görbéket ábrázoltuk.

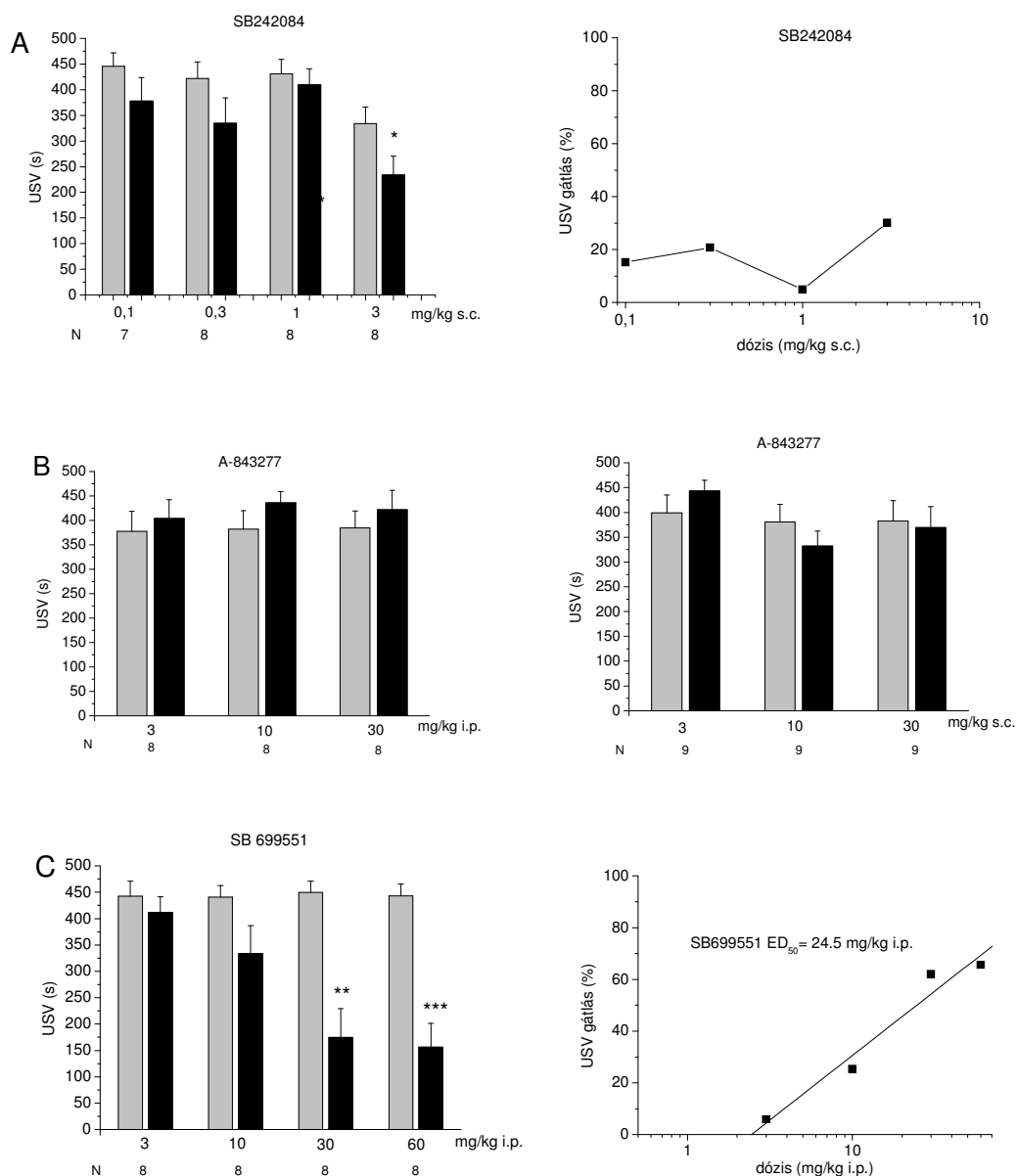
Az mGlu₅ receptor negatív allosztérikus modulátor MTEP 3 mg/kg-tól (3 mg/kg: $t=7,3$; $df=15$; $p < 0,001$; 12 mg/kg: $t=5,0$; $df=11$; $p < 0,001$; 24 mg/kg: $t=4,8$; $df=11$; $p < 0,001$), az MPEP 1,5 mg/kg-tól (1,5 mg/kg: $t=5,0$; $df=11$; $p < 0,001$; 3 mg/kg: $t=4,3$; $df=11$; $p < 0,01$; 6 mg/kg: $t=6,9$; $df=11$; $p < 0,001$; 10 mg/kg: $t=6,5$; $df=13$; $p < 0,001$; 30 mg/kg: $t=5,0$; $df=14$; $p < 0,001$) szignifikánsan gátolta az USV-t (14. ábra). A két anyag dózis-hatás görbéjének meredeksége alacsony volt, a vegyületek 50-60% körül maximális gátlást mutattak (14. ábra). Az MPEP 3,8 mg/kg ED₅₀ értéket produkált, az MTEP esetében nem lehetett az ED₅₀ értéket megállapítani a vizsgált dózisok alapján.



14. ábra. Az MPEP és MTEP hatása a többszöri sokkolásos USV modellben. Az oszlopdiagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlopok a kontroll napot, a fekete oszlopok a kezelési napot jelölik. A hibasávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok kontrolltól való szignifikáns különbségeket jelölik (t-teszt Holm korrekcióval, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$). Az alsó diagramon a százalékos USV gátlásokat és az MPEP esetében a lineáris regresszió alapján meghatározott dózis-hatás görbét tüntettük fel. Az MPEP esetében a fehér háromszöggel jelölt 30 mg/kg-os dózis gátlási értékét nem vettük figyelembe az ED₅₀ számításánál.

Az 5-HT_{2C} antagonistá SB-242084, bár csökkentette az USV-t a többszöri sokkolásos elrendezésben, hatása csak a legmagasabb, 3 mg/kg-os dózisban volt szignifikáns (3 mg/kg: $t=3,9$; $df=8$; $p < 0,01$) alacsony, 30%-os gátlási értékkel (15. ábra).

A két 5-HT_{5A} receptor antagonistá közül az A-843277 nem csökkentette az USV-t sem i.p., sem s.c. adagolás után (15. ábra). Ezzel szemben az SB-699551 30 mg/kg-tól szignifikánsan csökkentette az USV-t (30 mg/kg: $t=5,3$; $df=7$; $p < 0,01$; 60 mg/kg: $t=6,7$; $df=7$; $p < 0,001$), ED₅₀ értéke 24,5 mg/kg volt (15. ábra).



15. ábra. Az 5-HT_{2C} antagonistá SB242084 (A), 5-HT_{5A} antagonistá A-843277 (B) és az SB699551 (C) hatása a többszöri sokkolásos modellben. Az oszlopdiaagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlopok a kontroll napot, a fekete oszlopok a kezelési napokat jelölik. A hibásávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns különbségeket jelölik (t-teszt Holm korrekcióval, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$). A grafikonokon a százalékos USV gátlásokat és az SB699551 esetében a lineáris regresszió alapján meghatározott dózis-hatás görbét tüntettük fel.

5.1.3.2. Az eredmények megvitatása

Az alprazolámhoz hasonlóan a másik két benzodiazepin, a diazepám és a CDP is hatékony volt a többszöri sokkolásos modellben. A 8-OH-DPAT-hez hasonlóan a szintén 5-HT_{1A} agonista hatású buspiron is hatékonyan csökkentette az USV-t.

A többszöri sokkolásos protokollban korábban még nem tesztelt anyagok közül az mGlu5 receptor negatív allosztérikus modulátorai, az MPEP és az MTEP szorongásoldónak bizonyultak, hasonlóan más tesztekben mutatott hatásukhoz (Brodkin és mtsai, 2002; Busse és mtsai, 2004; Klodzinska és mtsai, 2004; Nordquist és mtsai, 2007). A két anyag dózis-hatás görbéje a benzodiazepinekhez és a buspironhoz képest kevésbé volt meredek, és maximálás gátlásuk is csupán 50-60% körüli alakult.

Nem sikerült robusztus szorongásoldó hatását kimutatni az 5-HT_{2C} antagonistá SB-242084 anyaggal. Bár a vokalizációk átlaga minden tesztelt dózis esetében alacsonyabb volt a kontroll napi átlagértéktől, ez a különbség csak a legnagyobb tesztelt dózisban volt statisztikailag szignifikáns. Egy másik 5-HT_{2C} antagonistá vegyület, az S32006 szintén nem csökkentette az USV-t egy sokkolási környezethez társításos modellben (Dekeyne és mtsai, 2008). Ezek alapján úgy tűnik, hogy az 5-HT_{2C} antagonisták nem hatékonyak a sokk indukálta USV modellekben. Ez azért meglepő, mert az SB-242084 csökkentette az anxiogén, 5-HT_{2A/2C} agonista mCPP USV fokozó hatását (Campbell és Merchant, 2003), valamint az irodalmi adatok alapján az 5-HT_{2C} antagonistá vegyületek szorongásoldó hatást mutatnak számos más állatmodellben (Kennett és mtsai, 1997; Kántor és mtsai, 2005; Dekeyne és mtsai, 2008).

A két vizsgált 5-HT_{5A} antagonistá vegyület eltérő hatásprofilot mutatott a többszöri sokkolásos modellben. Az A-843277 nem volt hatékony i.p. adagolást követően. A nyílt porond tesztben elvégzett megfigyelések eredményei arra utalnak, hogy az anyag 30 mg/kg-os dózisa hasi irritációt okozhat (Kassai és mtsai, 2012). Mint ahogy azt a 2. fejezetben leírtuk, USV-vel belső negatív állapotot is kifejezhetnek az állatok (pl. drogmegvonás vagy krónikus fájdalom esetén). Így nem zárható ki, hogy az abdominális irritáció elfedhet egy gyengébb USV csökkentő hatást. Ezért a vegyületet s.c. adagolás után is teszteltük a modellben, de így sem mutatott szorongásoldó hatást. Szemben az A-843277-el, az SB-699551-A gátolta az USV-t. Ez a hatása csak magas dózisokban volt szignifikáns, ahol az anyag már csökkentette a lokomotoros aktivitást a nyílt aréna (open-field) tesztben (Kassai és mtsai, 2012). Így nem zárható ki, hogy az USV gátlást egy aspecifikus szedáló hatás eredményezte. Az SB-699551-A, eltérően az A-843277-től,

patkányban a szerotonin transzporter fehérjéhez is kötődik (Thomas és mtsai, 2006). Így az is elképzelhető, hogy az USV csökkentő hatást nem az 5-HT_{5A} receptorok gátlása, hanem a szerotonin transzporter gátlása eredményezte.

5.2. Az MTEP és rimonabant együttes hatása

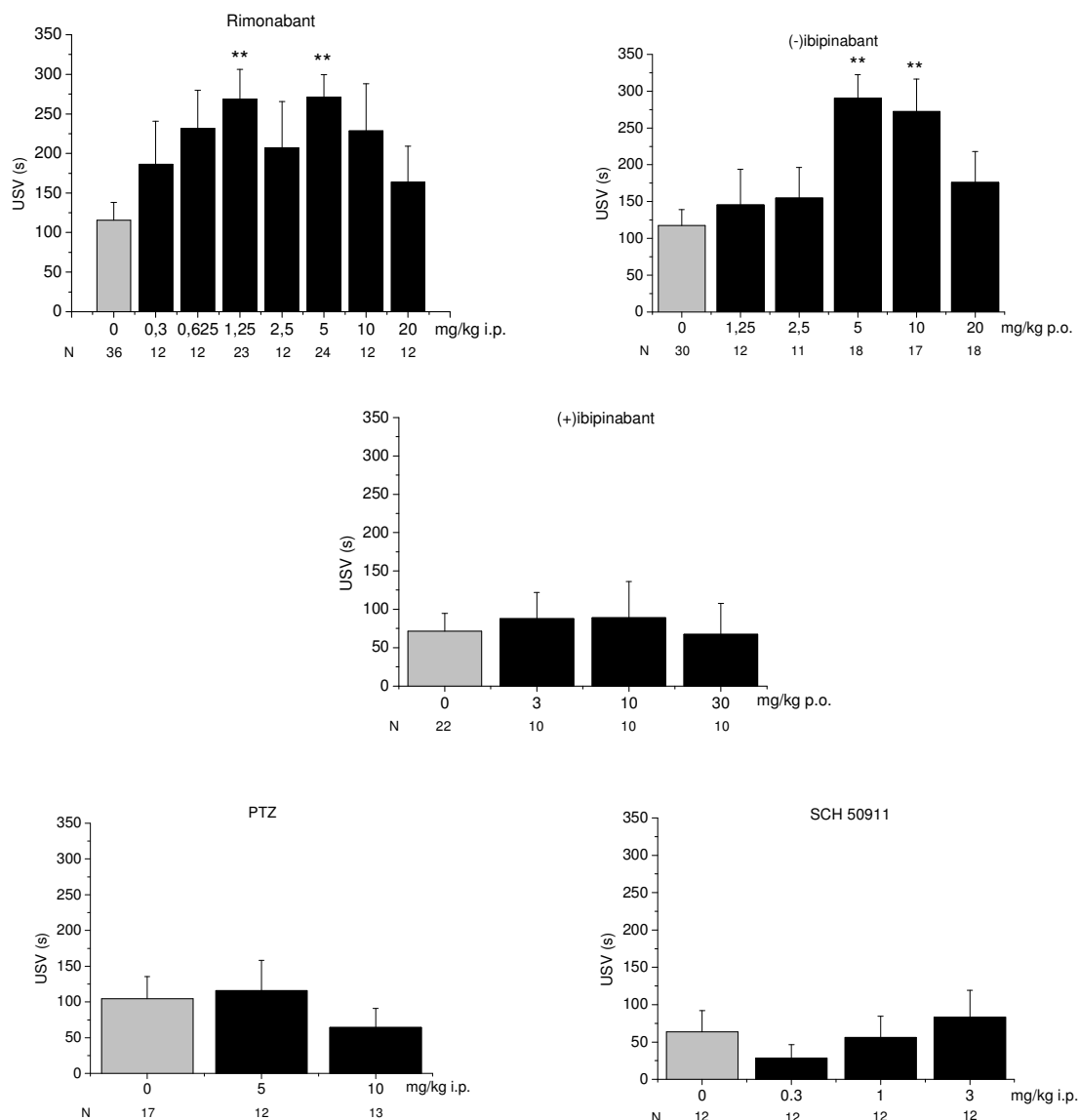
Ebben a kísérletsorozatban a memóriarontó és szorongásoldó hatású MTEP és a memóriajavító és szorongáskeltő hatású rimonabant memóriára és szorongásra gyakorolt együttes hatását vizsgáltuk.

A mérésekhez beállítottunk egy felnőtt patkányok USV fokozásán alapuló anxiogenitás modellét, valamint a sokkolási környezethez társításos protokoll memória akvizíciós paradigmáját. A két anyag együttes adagolásának hatását a fent említett két modellben, valamint az egyszeri sokkolásos paradigmában teszteltük, mely utóbbi modellől csupán a magasabb sokkolás erősségben különbözött az anxiogenitás paradigma.

5.2.1. A CB₁, GABA_A és GABA_B receptor antagonisták USV fokozó hatása

A szorongáskeltő anyagok vizsgálatához az 5.1.1. fejezetben bemutatott mérések alapján az 1 ütés/0,4 mA-es sokkolást választottuk. Az eredmények alapján megállapítható, hogy ennél a sokkerősségnél az állatok nagy része elkezdett vokalizálni, de a vokalizációk időtartama általában még alacsony volt. Így várhatóan egy szorongáskeltő anyag mind a vokalizáló állatok számát, mind a vokalizációk időtartamát növelni tudja.

A CB₁ antagonistá rimonabant [F(7;159)=3,1; p<0,01] és a (-)ibipinabant [F(5;101)=4,3; p<0,01] szignifikánsan fokozta a vokalizációt. Mindkét anyag dózis-hatás görbéje harang alakú volt (16. ábra). Az ibipinabant inaktív izomerje, a (+)ibipinabant hatástalannak bizonyult [F(3;48)=0,10; p>0,05]. A CB₁ antagonistá vegyületekkel szemben sem a GABA_A antagonistá PTZ [F(2;36)=0,63; p>0,05] sem a GABA_B antagonistá SCH50911 [F(3,64)=0,64; df=3 p>0,05] nem emelte az USV időtartamát (16. ábra).



16. ábra. A rimonabant, a (-)ibipinabant és a (+)ibipinabant, valamint a PTZ és az SCH50911 hatása az anxiogenitás USV modellben. A diagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlopok a kontroll csoportot, a fekete oszlopok a kezelést jelölik. A hibaszávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok kontrolltól való szignifikáns különbségeket jelölik (one-way ANOVA, Dunnett post hoc, ** $p < 0,01$).

5.5.2. A beállított modell alkalmassága szorongáskeltő mellékhatással rendelkező vegyületek szűrésére

Nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre anxiogén anyagok felnőtt patkányok USV-jére gyakorolt hatásáról. A CB_1 antagonistá rimonabant a bazolaterális amygdala-ba adagolva emelte az USV-t (Roche és mtsai, 2007). CB_1 antagonistá vegyületeket szisztémás adagolás után ebben a tekintetben még nem vizsgáltak. Méréseinkben mind a

rimonabant mind a (-)ibipinabant anxiogén hatást mutatott szisztémás adagolás után. Az utóbbi anyag inaktív izomerje hatástalan volt a tesztben. Ez arra utal, hogy az USV emelkedése nem egy aspecifikus hatás, hanem a CB₁ receptorokon kifejtett anyaghatás eredménye. A CB₁ antagonisták általunk megfigyelt anxiogén karakterének látszólag ellentmond, hogy a CB₁ agonista CP55940 szintén növelte az USV-t (Arnold és mtsai, 2010)., Ez utóbbi eredmény azonban egy másfajta (környezethez társításos) elrendezésben született, továbbá az irodalmi adatok alapján a CB₁ agonisták egyéb szorongás modellekben is hol szorongásoldó, hol pedig szorongáskeltő hatást mutattak (Rodgers és mtsai, 2003).

A GABA_A gátló PTZ-t nem növelte a vokalizációt. Bár GABA_A gátló vegyületek más állatmodellekben anxiogén hatást mutatnak (Garcia és mtsai, 2011), az USV-re gyakorolt hatásuk ellentmondásos. A PTZ felnőtt patkányban fokozta az USV-t egy kondicionált kísérleti elrendezésben (Jelen és mtsai, 2003), viszont ugyanebben a kísérletben a szintén GABA_A receptor gátló FG7142 nem mutatott szorongáskeltő hatást, továbbá a GABA_A receptor gátló anyagok az újszülött patkányok vokalizációit sem fokozták (Kehne és mtsai, 1991, Olivier és mtsai, 1998a). Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a GABA_A receptorok gátlása nem feltétlenül jár USV fokozással.

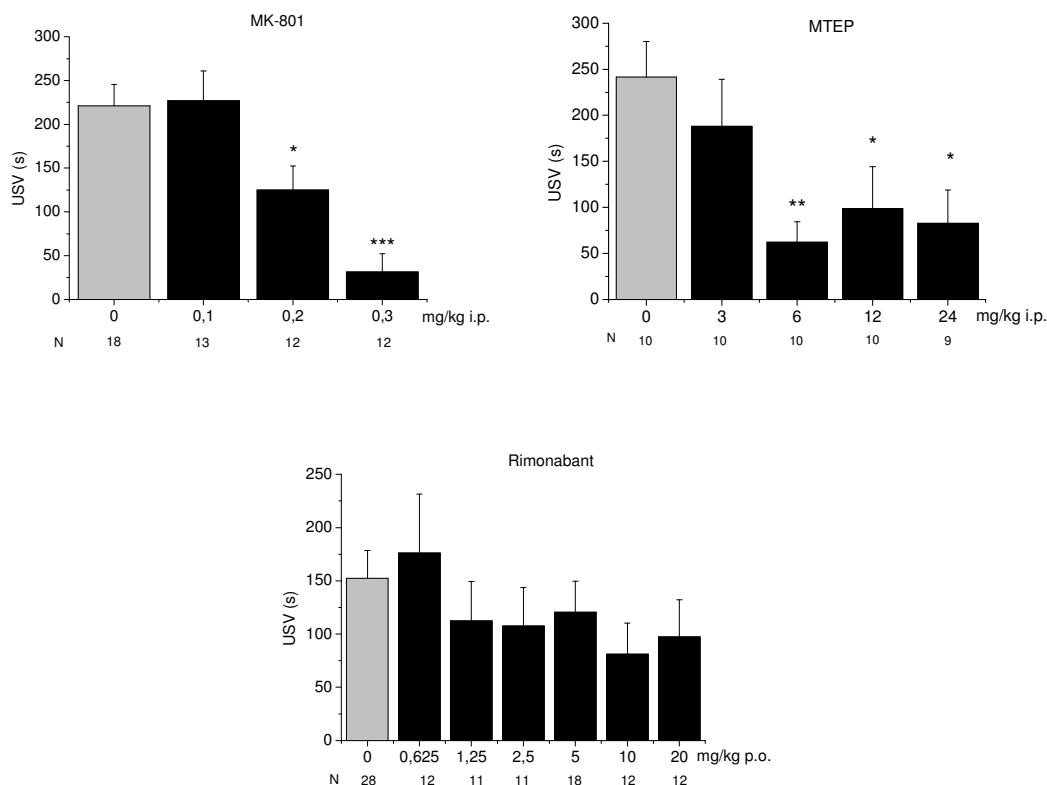
Bár a GABA_B agonista baclofen állatmodellekben anxiolitikus hatást mutatott (Shephard és mtsai, 1992; Andrews és mtsai, 1993), valamint a mi egyszeri sokkolásos protokollunkban is gátolta az USV-t (a dolgozatban ezeket az eredményeket nem mutattuk be), a GABA_B antagonist SCH50911 nem mutatott szorongáskeltő hatást. Ez alapján azonban nem zárható ki teljes bizonyossággal, hogy a GABA_B antagonist ligandok nem fokozzák a szorongást, hiszen a GABA_A gátlók anxiogén hatását is csak bizonyos esetekben sikerült kimutatni USV modellekben.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a beállított módszerrel kimutatható a CB₁ antagonisták szorongáskeltő hatása. Ezzel szemben a GABA_A receptorokat gátló anyagokra a teszt nem érzékeny. Elképzelhető, hogy más vegyületekhez képest a CB₁ antagonisták szorongásfokozó hatása sokkal erőteljesebb ebben a modellben. A kérdés tisztázása további vizsgálatokat igényel.

5.5.3 A MK-801, MTEP és a rimonabant hatása a félelmi memória akvizíciójára a sokkolási környezethez társításos USV protokollban

Az NMDA receptor antagonist MK-801 [$F(3;51)= 11,0$; $p<0,001$] és az mGlu5 receptor antagonist MTEP [$F(4;44)=3,7$; $p=0,01$] szignifikánsan rontotta az akvizíciót a

sokkolási környezethez társításos USV protokollban (17. ábra). A CB₁ receptor antagonistá rimonabant a várakozásokkal ellentétben nem javította az akvizíciót (17. ábra), hanem egy nem szignifikáns rontó tendenciát mutatott [$F(6;97)=0,83$, $p<0.54$].



17. ábra. Az MK-801, az MTEP és a rimonabant hatása a környezethez kondicionált USV protokollban. A diagramokon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlop a kontroll csoportot a fekete oszlopok a kezelt csoportokat jelölik. A hibásávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok kontrolltól való szignifikáns különbségeket jelölik (one-way ANOVA, Dunnett post hoc * $p<0,05$ ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

5.5.4. A sokkolási környezethez társításos USV paradigma, mint memória modell

Az MTEP és az MK-801 rontotta a félelmi memória akvizícióját, ami összhangban van az irodalmi adatokkal. Az mGlu₅ receptor antagonisták memóriarontó hatását kimutatták már mind félelmi (Gravius és mtsai, 2005), mind térbeli (Homayoun és mtsai, 2004; Steckler és mtsai, 2005b; Christoffersen és mtsai, 2008) memória modellekben. Az MK-801 szintén rontotta a memóriát félelmi (Caramonos és Shapiro, 1994; Gould és mtsai, 2002) és térbeli (Bernaerts és mtsai, 2004) memória tesztekben is.

Bár a CB₁ agonisták rontották, míg az antagonisták javították a memóriát számos állatmodellben (Zanettini és mtsai, 2011), a rimonabant a tesztünkben inkább egy rontó

tendenciát mutatott. Az irodalmi adatok a CB₁ ligandok félelmi memória akvizíciójára gyakorolt hatását illetően nem egybehangzóak. A klasszikus, sokkolási környezethez társított félelmi reakció teszt (contextual fear conditioning) elrendezése hasonló a sokkolási környezethez társított USV teszthez, csak ebben a modellben nem az USV-t, hanem az állatok dermedési reakcióját mérik az expressziós napon. Ebben a paradigmában a CB₁ agonista (R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanon (WIN55212-2) rontotta (Pamplona és Takahashi, 2006), míg az inverz agonista 1-(2,4-diklorofenil)-5-(4-jodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil)pirazol-3-karboxamid (AM251) javította az akvizíciót (Sink és mtsai, 2010). Ezzel szemben a kulcsingerhez társításos félelmi memória modellben az AM251 számos esetben rontotta az akvizíciót, valamint a memória konszolidációt (Arenos és mtsai, 2006; Sink és mtsai, 2010; Tan és mtsai, 2010), míg egy vizsgálatban a rimonabant nem befolyásolta az akvizíciót (Marsicano és mtsai, 2002). Továbbá, a CB₁ antagonisták rontották a félelmi memória akvizícióját és konszolidációját az amygalába (Bucherelli és mtsai, 2006; Campolongo és mtsai, 2009), a hippocampus-ba (De Oliveira Alvarez és mtsai, 2006; De Oliveira Alvarez és mtsai, 2008), illetve a kéregi területekbe (Laviolette and Grace, 2006; Tan és mtsai, 2010) történő adagolás után. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a CB₁ antagonizmus akár a félelmi memória akvizíciójának a rontását is okozhatja.

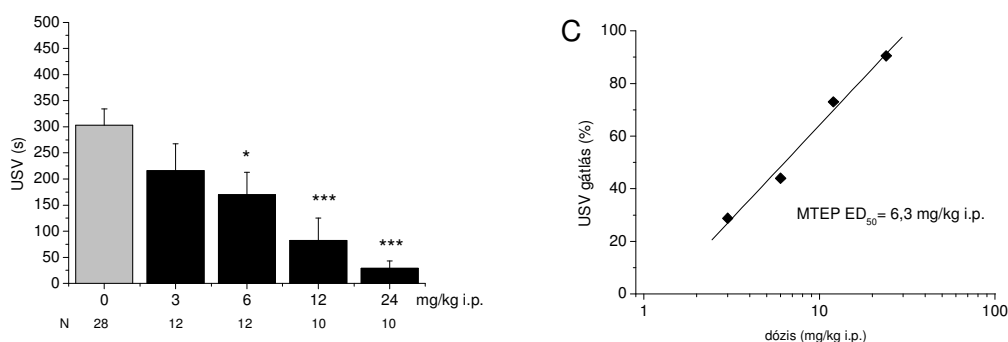
A kísérleti eredmények alapján megállapítható, hogy a sokkolási környezethez társított félelmi reakció modellhez hasonlóan, a sokkolási környezethez társított USV modell is alkalmas a félelmi memóriarontás tesztelésére.

5.5.5. A MTEP és a rimonabant együttes hatása az egyszeri sokkolásos és az anxiogenitás modellben, valamint a sokkolási környezethez társított USV modell akvizíciós paradigmájában

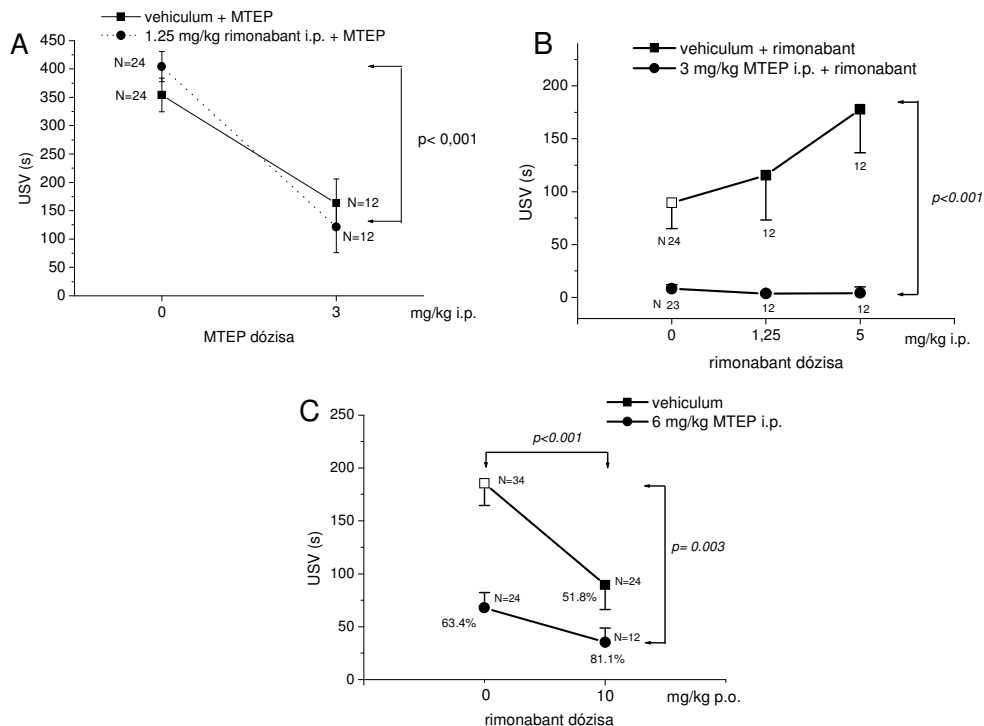
Az egyszeri sokkolásos beállításban az MTEP szignifikánsan csökkentette az USV-t ($F(4,64)=8,3$; $p<0,001$). Az anyag dózis-hatás görbéje lineáris volt 6,3 mg/kg ED₅₀ értékkel (18. ábra).

Az egyszeri sokkolásos elrendezésben az MTEP szorongásoldó hatását a rimonabant nem befolyásolta [rimonabant: $F(1;68)=0,01$; $p=0.656$; MTEP: $F(1;68)=44,1$; $p<0.001$; interakció: $F(1;68)=1,67$; $p=0,20$] (19/A ábra), valamint az anxiogenitás tesztben a rimonabant szorongáskelő hatását az MTEP teljes mértékben gátolni tudta [rimonabant: $F(2,89)=1.88$ $p=0.16$, MTEP: $F(1,89)=33.5$ $p<0.001$, interakció: $F(2,89)=1.63$ $p=0.2$] (19/B ábra).

A sokkolási környezethez társításos USV tesztben mindkét anyag rontotta a memória akvizíciót [rimonabant: $F(1;88)=7,98$ $p<0,01$; MTEP $F(1;88)=14,25$; $p<0,001$] (19/C ábra). A két anyag együttes adagolása után a rontás mértéke magasabb volt, mint az egy anyaggal kezelt csoportokban (19/C ábra), de az interakció nem volt szignifikáns [$F(1;88)=1,95$; $p=0,16$].



18. ábra. Az MTEP hatása az egyszeri sokkolásos protokollban. Az oszlopdigramon az USV átlagos időtartama látható. A szürke oszlop a kontroll csoportot a fekete oszlopok a kezelt csoportokat jelölik. A hibasávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns különbségeket jelölik (one-way ANOVA, Dunnett post hoc $*p<0,05$, $***p<0,001$). A pontdiagramon a százalékos USV gátlásokat, valamint a lineáris regresszió alapján meghatározott dózis-hatás görbét ábrázoltuk.



19. ábra. Az MTEP és a rimonabant együttes hatása az egyszeri sokkolásos (A), az anxiogenitás (B) és a sokkolási környezethez társításos (C) USV modellekben. A pontok az USV átlagát, a hibasávok a SEM-et jelzik. N a csoportonkénti mintaelem számot, a százalékok a kontrollhoz mért százalékos gátlást jelölik. Statisztika: two-way ANOVA.

5.5.6. Kombinált mGlu₅ és CB₁ receptor antagonistá hatással rendelkező vegyületek elhízás elleni szerként történő fejleszthetősége

Bár a CB₁ receptor gátló rimonabant és az mGlu₅ receptor gátló MTEP együttes adagolás után additív táplálékfelvétel csökkentő hatást mutatott patkányokban (Varga és mtsai, 2012), és az MTEP mindkét kísérletben gátolta a rimonabant szorongáskeltő hatását, együttes adagolásuk fokozott memóriaromláshoz vezetett. Ez megkérdőjelezi a kombináció klinikai alkalmazhatóságát. Bár a kísérleteket a két legjobban vizsgált mGlu₅ és CB₁ receptor antagonistával végeztük el, nem zárható ki, hogy más funkcionális karakterisztikával rendelkező antagonisták kombinációja kedvezőbb profilt mutatott volna.

A három kísérlet jól demonstrálja, hogy az USV tesztek nem csak szűrő módszerként alkalmazhatóak, hanem a különböző teszt protokollok megfelelő kombinációjának használatával akár összetett gyógyszerfejlesztési kérdésekre is választ kaphatunk általuk.

5.6. Mesterséges és természetes ultrahangokkal kiváltott dermedési reakció vizsgálata

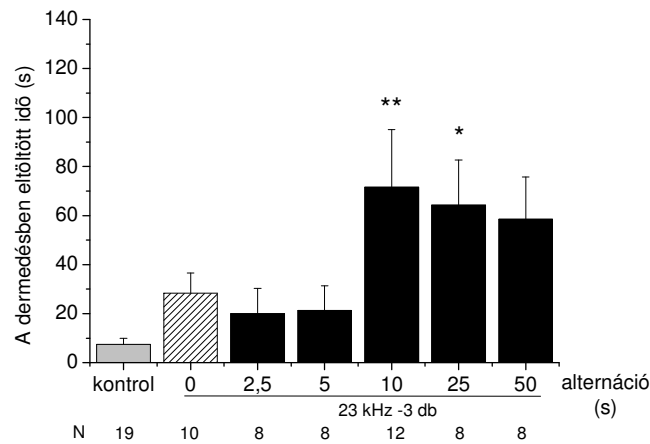
Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy 22-24 kHz-es ultrahang lejátszásával kiváltható-e olyan mértékű dermedési reakció, melynek gátlására szorongás modellt lehet alapozni.

5.6.1. A szakaszos lejátszás és a frekvencia hatása a dermedés mértékére, valamint a természetes és generált hangok összehasonlítása

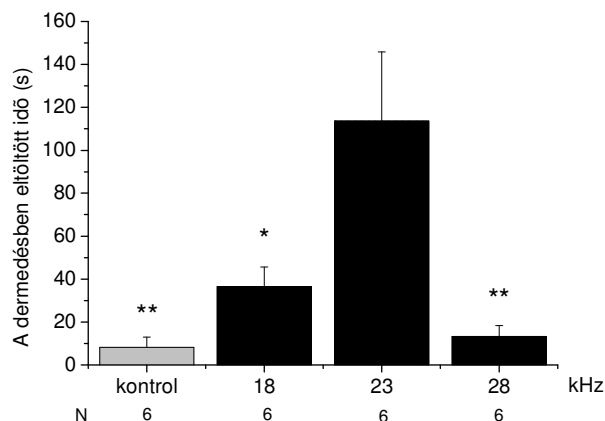
A mesterségesen generált 23 kHz-es ultrahangok szakaszos lejátszása szignifikáns hatással volt a kiváltott dermedés mértékére [$F(6;66)=3,9$; $p<0,01$]. Azok a csoportok, melyek folyamatos ultrahangot, vagy 2,5 és 5 másodperces ultrahang impulzusokat kaptak nem töltöttek több időt a dermedésben, mint a kontroll csoport, melyet nem tettünk ki ultrahangnak (20. ábra). Ezzel szemben azok az állatok, melyeknek 10, 25 és 50 másodperces impulzusokat játszottunk le, több időt töltöttek dermedésben a kontrollhoz képest, a különbség a 10 és 25 másodperces impulzusok esetében szignifikáns volt (20. ábra).

A 25 másodperces ultrahang impulzusokkal kiváltott dermedés mértéke szignifikánsan függött a lejátszott hang frekvenciájától [$F(3;20)=8,1$; $p<0,01$]. A 18 és 28 kHz-es hangok nem váltottak ki magasabb dermedést a kontrollhoz képest, egyedül a 23 kHz-es hangok hatása volt szignifikáns (21. ábra).

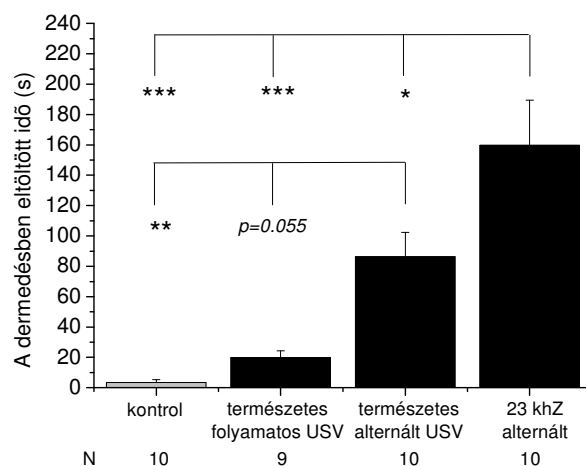
Különbség volt a természetes és a mesterséges ultrahangok által kiváltott dermedés mértékében [$F(3;35)=16,8$; $p<0,001$]. A folyamatosan visszajátszott természetes ultrahangok nagyjából kontroll szintű dermedést váltottak ki az állatokból (22. ábra). Ezzel szemben 25 másodperces hangimpulzusok szignifikánsan emelték az dermedés értéket mind a mesterségesen generált ultrahang, mind a természetes USV esetében, de szakaszosan lejátszott generált ultrahangok nagyobb mértékben emelték a dermedés idejét, mint a szakaszosan lejátszott természetes USV (22. ábra).



20. ábra. Az ultrahang és csend váltakozásának (alternáció) hatása a dermedésben eltöltött időre. Az oszlopok a dermedési reakció átlagos idejét mutatják. A szürke oszloppal jelölt kontroll csoport nem volt kitéve ultrahangnak, a csíkos oszlop a folyamatos ultrahang-kezelést (0 másodperces alternációt) jelöli. A hibasávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot Statisztika: one-way ANOVA +Duncan post hoc * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).



21. ábra. A 25 s ultrahang/25 s csend alternált hangok frekvenciájának hatása a dermedésben eltöltött időre. Az oszlopok a dermedési reakció átlagos idejét mutatják. A szürke oszloppal jelölt kontroll csoport nem volt kitéve ultrahangnak. A hibasávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot Statisztika: one-way ANOVA +Duncan post hoc * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ a 23 kHz-es csoporthoz viszonyítva.



22. ábra. A 25 s ultrahang/25 s csend alternált természetes USV és generált hangok, valamint a folyamatos természetes USV hatása a dermedésben eltöltött időre. Az oszlopok a dermedési reakció átlagos idejét mutatják. A szürke oszloppal jelölt kontroll csoport nem volt kitéve ultrahangnak, a hibásávok a SEM-et jelzik, N a csoportonkénti mintaelem számot. Statisztika: one-way ANOVA +Duncan post hoc * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

5.6.2. Az ultrahang lejátszással kiváltott dermedés szorongás modellként történő alkalmazhatósága

A szakaszosan lejátszott hangok nagyobb mértékben emelték a dermedésben eltöltött időt, mint a folyamatos hangok. Ennek oka lehet egyrészt az, hogy a szakaszos lejátszásnak információ tartalma van, hiszen az USV-t is szakaszokban bocsátják ki az állatok. Másrészt az is elképzelhető, hogy amikor a hang megszólal az állat megijed, és megfelelő hosszúságú hang impulzus és hangok közötti szakasz megválasztása esetén ez a jelenség többször is megismétlődik a mérés során, ami hosszabb idejű dermedési reakcióhoz vezet. Bár a videofelvételek kiértékelése során valóban látszott, hogy a hangimpulzusok megszólalásakor az állatok összerезzennek, de mivel a csak a 23 kHz-es szakaszosan lejátszott hangok váltottak ki dermedést, így valószínűtlennek tűnik, hogy a szakaszos lejátszás csupán ezért volt hatékonyabb.

Meglepő módon a generált hangok nagyobb mértékű dermedést váltottak ki, mint a természetes USV visszajátszása. Ennek oka lehet az, hogy a természetes ultrahangok visszajátszása során az átlagos hangerő alacsonyabb volt, mint a mesterséges hangok esetében. Az USV amplitúdója nem állandó, és így a hangerősség beállításánál a legnagyobb amplitúdójú hangokhoz kellett a maximumot viszonyítani, azért, hogy a legnagyobb hangerejű részeket is torzításmentesen lehessen lejátszani. Ennek megfelelően a mesterségesen generált hangok kísérletezési szempontból jobbak, mivel hangerősségük

jobban szabályozható. A mesterséges hangok mellett szól az is, hogy szemben a természetes hangokkal, megfelelő eszköztárral ugyanolyan mesterséges hang ismételtén állítható elő bármikor.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy ultrahang lejátszással kiváltható olyan mértékű dermedés, amely már alkalmas szorongás oldó hatású vegyületek tesztelésére. A tesztelések során figyelembe kell venni, hogy egy esetleges szedáció miatt kialakuló immobilitás nehezen elkülöníthető a dermedési reakciótól. A módszer validálása további kísérletes munkát igényel.

6. Konklúzió

Többféle elrendezésben is kialakítható a patkányok talpsokkal kiváltott ultrahangos vokalizációján alapuló szorongás teszt. A dolgozatban tárgyalt három elrendezésben, az egyszeri és a többszöri sokkolásos, valamint a sokkolási környezethez társításos USV tesztben egyes szorongásoldó hatású vegyületek, elsősorban a szerotonerg rendszeren keresztül hatóak, más karakterisztikát mutatnak. Ennek megfelelően a három tesztprotokollt tulajdonképpen három különböző szorongásmodellnek lehet tekinteni, melyek más prediktív értékkel bírnak.

A három szorongás-paradigma nem tekinthető betegség modellnek. Egyik sem egy adott szorongásos betegség fő tünetét modellezi, hanem mindegyik az adott kísérleti elrendezésben kialakított stressz helyzet indukálta fiziológiás szorongási választ mér. Az egyes szorongásos betegségek modellezéséhez sokkal kifinomultabb, és ennek megfelelően sokkal idő- és munkaigényesebb módszerek szükségesek. Ezzel szemben a három USV modellben az anyagok rövid idő alatt tesztelhetők, így gyógyszerfejlesztés során szűrőtesztnek alkalmazhatóak. Általánosságban, a három vizsgált protokoll közül az irodalomban leggyakrabban használt többszöri sokkolásos elrendezés a legalkalmasabb szűrő tesztnek, mérési kapacitását és anyaghatásokra való érzékenységet tekintetbe véve. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni, hogy nem minden vegyületcsoport esetében feltétlenül ez a legmegfelelőbb szűrő módszer, valamint hogy a három modell kombinált alkalmazásával a tesztelt vegyületek jobban karakterizálhatóak.

A talpsokk kiváltotta USV modellek beállítása során a megfelelő sokkolási erősség megválasztása rendkívül fontos. Ennek során figyelembe kell venni, hogy a sokkolás erőssége és a vokalizációk szintje közötti összefüggés nem feltétlenül lineáris.

A sokkolás erőssége mellett fontos a patkánytörzs kiválasztása is, mivel azonos sokkolási intenzitás esetében jelentős USV szint különbségek figyelhetők meg közöttük. Az eredményeink alapján a Wistar patkányok a legmegfelelőbbek a kísérletekhez.

Hasonlóan más szorongás modellekhez, az anyagok tesztelése során figyelembe kell venni azok esetleges szedatív hatását. A talpsokk indukálta USV modellekben a szorongásoldó és a szedatív hatást nehéz egyértelműen elkülöníteni, legcélszerűbb más, kifejezetten a szedációt mérő módszerek alkalmazásával meghatározni a szedatív dózistartományt.

A szorongásoldás és szorongáskeltés tesztelése mellett, kialakítható olyan kísérleti elrendezés is, amelyben anyagok memóriarontó mellékhatása is vizsgálható.

Az egyes modellek kombinált alkalmazásával összetett gyógyszerfejlesztési kérdések is megválaszolhatóak. Ezt példázza a CB₁ és mGlu₅ antagonizmus együttes hatásának vizsgálata, melyben az MTEP ugyan gátolta a rimonabant szorongáskeltő hatását, a két anyag együttes adagolása azonban fokozottan rontotta a félelmi memóriát; emiatt egy elhízás csökkentő CB₁ és mGlu₅ antagonista kettős hatású vegyület gyógyszerfejlesztése a várható mellékhatásprofil miatt kockázatos.

A 22-24 kHz-es ultrahanggal kiváltott dermedési-reakció teszt ígéretes szorongás modellnek tűnik. Szemben más, stressz indukálta szorongásmodellekkel, ebben a paradigmában a szorongásos állapotot nem egy fizikailag kellemetlen külső behatás vagy ahhoz társított környezet vagy kulcs inger váltja ki, hanem a 22-24 kHz-es hangok természetes, negatív jelentéstartalma. A modell validálásához további kísérletek szükségesek.

7. Összefoglalás

A felnőtt patkányok 22-24 kHz-es ultrahangos vokalizációján (USV) alapuló szorongásmodellekben számos vegyület szorongásoldó hatását mutatták már ki. A dolgozat ezeknek a modelleknek gyógyszerfejlesztésben történő alkalmazhatóságát, valamint az USV-n alapuló további modell beállítási lehetőségeket tárgyalja.

Három, talpsokk kiváltotta USV tesztprotokollt állítottunk be és hasonlítottunk össze ismert szorongásoldó hatású vegyületek tesztelésével. Az egyszeri sokkolásos elrendezésben az állatok a tesztanyaggal történő kezelést követő egyetlen ülésben kaptak talpsokkot. Az irodalmi adatok alapján leggyakrabban alkalmazott többszöri sokkolásos elrendezésben a tesztnapon lebonyolított és azt megelőző ülésekben is kaptak talpsokkot az állatok. A sokkolási környezethez társításos elrendezésben az állatok a tesztnapot megelőzően kaptak talpsokkokat, a tesztnapon visszakerültek a sokkolási környezetbe, de ekkor már nem kaptak áramütéseket. A három elrendezésben a klinikumban szorongásoldóként alkalmazott alprazolámot illetve négy szelektív szerotonin visszavételt gátló vegyületet vizsgáltunk meg. A benzodiazepin alprazolám mindhárom modellben hasonló hatásúnak bizonyult, ezzel szemben a szelektív szerotonin visszavétel gátlók eltérő hatásprofilot mutattak a három kísérleti elrendezésben. Ezek a vegyületek nem voltak hatékonyak az egyszeri sokkolásos elrendezésben, dózisarányos gátlást produkáltak a sokkolási környezethez társításos elrendezésben, míg egy köztes hatást mutattak a többszöri sokkolásos protokollban. Ennek megfelelően a három teszt protokoll tulajdonképpen három különböző szorongásmodellnek tekinthető.

Gyógyszerfejlesztési munkához a három modell közül mérési kapacitás és anyaghatások tekintetében a többszöri sokkolásos elrendezés a legalkalmasabb szűrőteszt. Ebben a modellben több anyagot teszteltünk, melyeket ebben az elrendezésben korábban még nem vizsgáltak. Az mGlu₅ receptor negatív allosterikus modulátorai hatékonyan csökkentették az USV-t. A vizsgált szerotonin 5-HT_{2C} receptor antagonistá gyenge hatást mutatott, míg az 5-HT_{5A} receptor antagonisák szorongásoldó hatása nem volt egyértelmű.

A modellek módosításával összetett gyógyszerfejlesztési kérdések is megválaszolhatók. Kérdésfelvetésünk volt, hogy a CB₁ és mGlu₅ antagonisták együttes alkalmazása megfelelő mellékhatás profilot mutat-e ahhoz, hogy egy kombinált hatásmechanizuson alapuló elhízás csökkentő szert lehessen kifejleszteni. Ehhez beállítottunk egy-egy USV alapú anxiogenitás és memória modellt. Az anxiogenitás

modell az egyszeri sokkolásos elrendezés módosított változata volt, amikor is az állatok egyetlen gyenge áramütést kaptak. Memória modellként a sokkolási környezethez társításos modell akvizíciós paradigmáját használtuk, vagyis az állatokat nem a tesztnapon, hanem az azt megelőző két sokkolásos napon kezeltük. Az együttes adagolás során az mGlu₅ antagonistá szorongásoldó hatása “felülírta” a CB₁ antagonistá indukálta szorongást, viszont a kombináció fokozottan rontotta a memóriát, így megállapítottuk, hogy a várható tanulásrontó mellékhatás miatt egy kombinált hatással rendelkező molekula fejlesztése kockázatos.

Vizsgáltuk továbbá, hogy lehetséges-e egy új, az USV visszajátzásán alapuló szorongásmodell beállítása. Az USV visszajátzása, valamint a 23 kHz-es generált ultrahang lejátszása mozdulatlan dermedési reakciót vált ki a patkányokból. Mérési eredményeink azt mutatják, hogy a mesterségesen generált, szakaszosan lejátszott 23 kHz-es ultrahangokkal olyan mértékű dermedés váltható ki, mely alapján egy új szorongásmodell dolgozható ki.

Összességében megállapítható, hogy a patkányok ultrahangos vokalizációjára alapozott állatmodellek jól használhatóak a gyógyszerfejlesztésben, valamint további modellek kifejlesztésére is lehetőség van.

8. Summary

Several anxiolytic compounds were reported to be effective in models based on the 22-24 kHz vocalizations of adult rats. In this thesis the applicability of these methods in drug development is analyzed, and some possibilities of further model development based on the 22-24 kHz vocalizations are also propounded.

Three USV protocols were established and compared by testing well known anxiolytic compounds. In the single shocking paradigm, animals were only exposed to shocking in a single (test) session following the drug treatment, while in the multiple shocking protocol, which is the most often applied method in the literature, animals were shocked not only in the test session, but also in sessions carried out on preceding days. In the contextual conditioned USV protocol rats received shocks before the test day; on the test day animals were replaced to the shocking chamber but shock was not delivered. In the three paradigms, the clinically applied anxiolytic alprazolam and four selective serotonin reuptake inhibitors were tested. The benzodiazepine alprazolam showed similar effects in each paradigm, while the selective serotonin reuptake inhibitors showed distinct characteristics in the three methods. These compounds were ineffective in the single shocking protocol, they displayed dose proportional USV inhibition in the contextual conditioned protocol, while displayed intermediate profile in the multiple shocking setup. Thus, the three test protocols can be regarded as three distinct anxiety models.

Based on testing capacity and drug effects, the multiple shocking paradigm is the most appropriate method as a screening test in drug developmental work. With this method, we tested several compounds, which had not been studied in this paradigm before. Negative allosteric modulators of mGlu₅ receptors were effective in this model, while the tested serotonin 5-HT_{2C} receptor antagonist ligand showed only weak USV inhibition. Anxiolytic effects of the 5-HT_{5A} receptor antagonists were not definite in the model.

With the modification of the models, complex drug developmental questions can also be answered. Our objective was to establish whether combined CB₁-mGlu₅ receptor antagonism would display appropriate side effect profile to allow the development of an antiobesity drug having a combined mechanism of action. For this purpose, an anxiogeny and a memory model were established. The anxiogeny model was a modified version of the single shocking protocol, where animals received a single, low current intensity shock. The acquisition paradigm of the contextual conditioned USV model was used as the memory test, where animals were drug-treated not on the test day but on the two preceding

shocking days. In co-administration experiments, the anxiogenic effect induced by CB₁ antagonist was “overridden” by the anxiolytic activity of mGlu₅ receptor antagonist, however the memory impairing effect of the combination was prominent. Accordingly, development of a molecule with the above combined action was deemed to be risky due to the expected cognitive side effect.

We also examined, whether a novel anxiety model could be developed based on the playback of USV. Playback of 22-24 kHz USV and playing of 23 kHz generated ultrasounds induced freezing in rats. The most intensive freezing was elicited by artificially generated 23 kHz ultrasound interrupted with silence periods. The level of freezing was high enough to allow the development of an anxiety test based on ultrasound induced freezing.

In conclusion, rat USV models provide valuable pharmacological tools for drug development, and offer so far unexploited possibilities for further model development.

Irodalomjegyzék

1. Addy C, Wright H, Van Laere K, Gantz I, Erondur N, Musser BJ, Lu K, Yuan J, Sanabria-Bohorquez SM, Stoch A, Stevens C, Fong TM, De Lepeleire I, Cilissen C, Cote J, Rosko K, Gendrano III IN, Nguyen AM, Gumbiner B, Rothenberg P, de Hoon J, Bormans G, Depre M, Eng Ws, Ravussin E, Klein S, Blundell J, Herman GA, Burns HD, Hargreaves RJ, Wagner J, Gottesdiener K, Amatruda JM, Heymsfield SB (2008). The Acyclic CB1R Inverse Agonist Taranabant Mediates Weight Loss by Increasing Energy Expenditure and Decreasing Caloric Intake. *Cell Metab* 7:68-78.
2. Andó RD, Ádori C, Kirilly E, Molnár E, Kovács GG, Ferrington L, Kelly PAT, Bagdy G (2010). Acute SSRI-induced anxiogenic and brain metabolic effects are attenuated 6 months after initial MDMA-induced depletion. *Behav Brain Res* 207:280-289.
3. Andrews N, File SE (1993) Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. *Eur J Pharmacol* 235:109-112.
4. Antoniadis EA, McDonald RJ (2006) Fornix, medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and mediodorsal thalamic nucleus: Roles in a fear-based context discrimination task. *Neurobiol Learn Mem* 85:71-85.
5. Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ (2006). Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *Eur J Pharmacol* 539:177-183.
6. Arnold JC, Dielenberg RA, McGregor IS (2010). Cannabinoids increase conditioned ultrasonic vocalisations and cat odour avoidance in rats: strain differences in drug-induced anxiety. *Life Sci* 87:572-578.
7. Bagdy G, Graf M, Anheuer ZE, Modos EA, Kantor S (2001). Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* 4:399-408.
8. Barfield RJ, Auerbach P, Geyer LA, Mcintosh TK (1979). Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *Am Zool* 19:469-480.
9. Bartoszyk GD (1998) Anxiolytic effects of dopamine receptor ligands: I. involvement of dopamine autoreceptors. *Life Sci* 62:649-663.
10. Bartoszyk GD, Hegenbart R, Ziegler H (1997) EMD 68843, a serotonin reuptake inhibitor with selective presynaptic 5-HT receptor agonistic properties. *Eur J Pharmacol* 332:147-153.
11. Beckett SR, Aspley S, Graham M, Marsden CA (1996). Pharmacological manipulation of ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 127:384-390.
12. Beckett SRG, Duxon MS, Aspley S, Marsden CA (1997). Central C-Fos Expression Following 20kHz/Ultrasound Induced Defence Behaviour in the Rat. *Brain Res Bull* 42:421-426.

13. Bernaerts P, Lamberty Y, Tirelli E (2004). Histamine H3 antagonist thioperamide dose-dependently enhances memory consolidation and reverses amnesia induced by dizocilpine or scopolamine in a one-trial inhibitory avoidance task in mice. *Behav Brain Res* 154:211-219.
14. Bertaina-Anglade V, Enjuanes E, Morillon D, Drieu la Rochelle C (2009). The object recognition task in rats and mice: A simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J Pharmacol and Toxicol Methods* 54:99-105.
15. Blanchard RJ, Blanchard DC, Agullana R, Weiss SM (1991). Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* 50:967-972.
16. Blumberg MS, Alberts JR (1991) On the significance of similarities between ultrasonic vocalizations of infant and adult rats. *Neurosci Biobehav Rev* 15:383-390.
17. Borta A, Wöhr M, Schwarting KWR (2006) Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 166:271-280.
18. Bradbury MJ, Campbell U, Giracello D, Chapman D, King C, Tehrani L, Consford ND, Anderson J, Varney MA, Strack AM (2005) Metabotropic glutamate receptor mGlu5 is a mediator of appetite and energy balance in rats and mice. *J Pharmacol Exp Ther* 313:395-402.
19. Brodtkin J, Busse C, Sukoff, SJ, Varney MA (2002) Anxiolytic-like activity of the mGluR5 antagonist MPEP A comparison with diazepam and buspirone. *Pharmacol Biochem Behav* 73:359-366.
20. Brudzynski SM, Chiu EMC (1995) Behavioural Responses of Laboratory Rats to Playback of 22 kHz Ultrasonic Calls. *Physiol Behav* 57:1039-1044.
21. Bucherelli C, Baldi E, Mariottini C, Passani MB, Blandina P (2006). Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learn Mem* 13:426-430.
22. Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J (2000). Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. *Behav Neurosci* 114:320-327.
23. Burgdorf J, Kroes RA, Moskal JR, Pfaus JG, Brudzynski SM, Panksepp J (2008) Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J Comp Psychol* 122:357-367
24. Burgdorf J, Wood PL, Kroes RA, Moskal JR, Panksepp J (2007). Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behav Brain Res* 182:274-283.

25. Busse C, Brodtkin J, Tattersall D, Anderson JJ, Warren N, Tehrani L, Bristow LJ, Varney MA, Cosford NDP (2004). The behavioral profile of the potent and selective mGlu5 receptor antagonist 3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl] pyridine (MTEP) in rodent models of anxiety. *Neuropsychopharmacol* 29:1971-1979.
26. Calvino B, Besson JM, Boehrer A, Depaulis A (1996). Ultrasonic vocalization (22-28 kHz) in a model of chronic pain, the arthritic rat: effects of analgesic drugs. *Neuroreport* 7:581-584.
27. Campbell BM, Merchant KM (2003). Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Res* 993:1-9.
28. Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Hauer D, Schelling G, McGaugh JL, Cuomo V (2009). Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4888-4893.
29. Caramonos Z, Shapiro ML (1994). Spatial memory and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists APV and MK-801: Memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. *Behav Neurosci* 108:30-43.
30. Castillo EP, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y (2012) Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. *Neuron* 76:70-81.
31. Chevaleyre V, Takahashi KA, Castillo PE (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29:37-76.
32. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* 370:1706-1713.
33. Christoffersen GRJ, Simonyi A, Schachtman TR, Clausen B, Clement D, Bjerre VK, Mark LT, Reinholdt M, Schmith-Rasmussen K, Zink LVB (2008). mGlu5 antagonism impairs exploration and memory of spatial and non-spatial stimuli in rats. *Behav Brain Res* 191:235-245.
34. Commissaris RL, Beckett SRG, Marsden CA (1998a). Strychnine effects on ultrasound-elicited behaviours in Lister hooded rats. *Psychopharmacology (Berl)* 136:162-171.
35. Commissaris RL, Beckett SR, Marsden CA (1998b). The effects of convulsant and anticonvulsant treatments on the behavioural effects of ultrasound presentation in Lister hooded rats. *Behav Pharmacol* 9:113-126.
36. Commissaris RL, Palmer A, Neophytou S, Graham M, Beckett S, Marsden CA (2000) Acoustically elicited behaviours in Lister hooded and Wistar rats. *Physiol Behav* 68:521-531.

37. Covington HE, Miczek KA (2003). Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: possible expressions of affective distress. *Eur J Pharmacol* 467:1-13.
38. Dastur FN, McGregor IS, Brown RE (1999). Dopaminergic modulation of rat pup ultrasonic vocalizations. *Eur J Pharmacol* 382:53-67.
39. Dazzi L, Seu E, Cherchi G, Biggio G (2005). Chronic administration of the SSRI fluvoxamine markedly and selectively reduces the sensitivity of cortical serotonergic neurons to footshock stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 15:283-290.
40. Dekeyne A, Denorme B, Monneyron S, Millan MJ (2000). Citalopram reduces social interaction in rats by activation of serotonin (5-HT)_{2C} receptors. *Neuropharmacol* 39:1114-1117.
41. Dekeyne A, Mannoury la Cour C, Gobert A, Brocco M, Lejeune F, Serres F, Sharp T, Daszuta A, Soumier A, Papp M, Rivet JM, Flik G, Cremers TI, Muller O, Lavielle G, Millan MJ (2008) S32006, a novel 5-HT_{2C} receptor antagonist displaying broad-based antidepressant and anxiolytic properties in rodent models. *Psychopharmacology (Berl)* 199:549-568.
42. De Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro, Diehl F, Quillfeldt JA (2008). Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* 90:1-9.
43. De Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro B, Vaz Breda R, Pedroso MF, Costa Da Costa J, Quillfeldt JA (2006). AM251, a selective antagonist of the CB₁ receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res* 1075:60-67.
44. De Vry J, Benz U, Schreiber R, Traber J (1993) Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. *Eur J Pharmacol* 249: 331-339.
45. De Vry J, Schreiber R, Melon C, Dalmus M, Jenzsch KR (2004) 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 14, 487-495.
46. Drake RG, Davis LL, Cates ME, Jewell ME, Ambrose SM, Lowe JS (2003) Baclofen treatment for chronic posttraumatic stress disorder. *Ann Pharmacother* 37:1177-1181.
47. Egashira N, Matsumoto Y, Mishima K, Iwasaki K, Fujioka M, Matsushita M, Shoyama Y, Nishimura R, Fujiwara M (2006). Low dose citalopram reverses memory impairment and electroconvulsive shock-induced immobilization. *Pharmacol Biochem Behav* 83:161-167.
48. FDA (2007) FDA briefing document, NDA 21-888, Zimulti (rimonabant) tablets, 20 mg, Sanofi Aventis Advisory Committee — June 13, 2007. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/07/briefing/2007-4306b1-fda-backgrounder.pdf>

49. Fendt M, Schwienbacher I, Schnitzler HU (2006). Carbachol injections into the nucleus accumbens induce 50 kHz calls in rats. *Neurosc Lett* 401:129-152.
50. Garcia AMB, Cardenas FP, Morato S (2011). The effects of pentylenetetrazol, chlórdiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination. *Behav Brain Res* 217:171-177.
51. Gould TJ, McCarthy MM, Keith RA (2002). MK-801 disrupts acquisition of contextual fear conditioning but enhances memory consolidation of cued fear conditioning. *Behav Pharmacol* 13:287-294.
52. Gravius A, Barberi C, Schäfer D, Schmidt WJ, Danysz W (2006). The role of group I metabotropic glutamate receptors in acquisition and expression of contextual and auditory fear conditioning in rats e a comparison. *Neuropharmacol* 51:1146-1155.
53. Gravius A, Pietraszek M, Schafer D, Schmidt WJ, Danysz W (2005). Effects of mGlu1 and mGlu5 receptor antagonists on negatively reinforced learning. *Behav Pharmacol* 16:113-121.
54. Gyertyán I, Sághy K, Kassai F, Szombathelyi Zs (2008). Anxiolytic-like activity in rat models of cariprazine (RGH-188), a dopamine D₃ receptor preferring antipsychotic agent with D₃/D₂ receptor partial agonist activity. 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 15-19 November, 2008, Washington DC, USA, Abstract 156.4
55. Han JS, Bird GC, Li W, Jones J, Neugebauer V (2005) Computerized analysis of audible and ultrasonic vocalizations of rats as a standardized measure of pain-related behavior. *J Neurosc Methods* 141:261-269. Ref ID: 148
56. Harada K, Aota M, Inoue T, Matsuda R, Mihara T, Yamaji T, Ishibashi K, Matsuoka N (2006) Anxiolytic activity of a novel potent serotonin 5-HT_{2C} receptor antagonist FR260010: a comparison with diazepam and buspirone. *Eur J Pharmacol* 553:171-184.
57. Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Mouly AM (2011). The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. *Front Behav Neurosci* 5:25.
58. Hinderer SR (1990) The supraspinal anxiolytic effect of baclofen for spasticity reduction. *Am J Phys Med Rehabil* 69:254-258.
59. Hodgson RA, Guthrie DH, Varty GB (2008). Duration of ultrasonic vocalizations in the isolated rat pup as a behavioral measure: Sensitivity to anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 88:341-348.
60. Hodgson RA, Higgins GA, Guthrie DH, Lu SX, Pond AJ, Mullins DE, Guzzi MF, Parker EM, Varty GB (2007). Comparison of the V1b antagonist, SSR149415, and the CRF1 antagonist, CP-154,526, in rodent models of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 86:431-440.

61. Hogan JB, Hodges DB, Jr., Lelas S, Gilligan PJ, McElroy JF, Lindner MD (2005). Effects of CRF1 receptor antagonists and benzodiazepines in the Morris water maze and delayed non-matching to position tests. *Psychopharmacol (Berl)* 178:410-419.
62. Homayoun H, Stefani MR, Adams BW, Tamagan GD, Moghaddam B (2004). Functional interaction between NMDA and mGlu5 receptors: effects on working memory, instrumental learning, motor behaviors, and dopamine release. *Neuropsychopharmacol* 29:1259-1269.
63. Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacol* 47:345-358.
64. Iijima M, Chaki S (2005). Separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups: Further pharmacological characterization. *Pharmacol Biochem Behav* 82:652-657.
65. Inagaki H, Kuwahara M, Kikusui T, Tsubone H (2005). The influence of social environmental condition on the production of stress-induced 22 kHz calls in adult male Wistar rats. *Physiol Behav* 84:17-22.
66. Izumi T, Suzuki K, Inoue T, Li XB, Maki Y, Muraki I, Kitaichi Y, Hashimoto S, Koyama T (2002). Long-lasting change in 5-HT_{2A} receptor-mediated behavior in rats after a single footshock. *Eur J Pharmacol* 452:199-204.
67. Janero DR, Makriyannis A (2009) Cannabinoid receptor antagonists: pharmacological opportunities, clinical experience, and translational prognosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 14:43-65.
68. Jelen P, Soltysik S, Zagrodzka J (2003) 22-kHz Ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behav Brain Res* 141:63-72.
69. Jolas T, Schreiber R, Laporte AM, Chastanet M, De Vry J, Glaser T, Adrien J, Hamon M (1995) Are postsynaptic 5-HT_{1A} receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat? *J Pharmacol Exp Ther* 272:920-929.
70. Jourdan D, Ardid D, Eschalier A (2002) Analysis of ultrasonic vocalisation does not allow chronic pain to be evaluated in rats. *Pain* 95:165-173.
71. Kalinichev M, Holtzman SG (2003). Changes in urination/defecation, auditory startle response, and startle-induced ultrasonic vocalizations in rats undergoing morphine withdrawal: similarities and differences between acute and chronic dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 304:603-609.
72. Kantor S., Jakus R, Molnar E, Gyongyosi N, Toth A, Detari L, Bagdy G (2005). Despite similar anxiolytic potential, the 5-hydroxytryptamine 2C receptor antagonist SB-242084 [6-chloro-5-methyl-1-[2-(2-methylpyrid-3-yloxy)-pyrid-5-yl carbamoyl] indoline] and chlordiazepoxide produced differential effects on electroencephalogram power spectra. *J Pharmacol Exp Ther* 315:929-930.

73. Kassai F, Gyertyán I (2012). Shock priming enhances the efficacy of SSRIs in the foot shock-induced ultrasonic vocalization test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 36:128-135.
74. Kassai F, Schlumberger C, Kedves R, Pietraszek M, Jatzke C, Lendvai B, Gyertyan I, Danysz W (2012). Effect of 5-HT_{5A} antagonists in animal models of schizophrenia, anxiety and depression. *Behav Pharmacol* 23:397-406.
75. Kehne JH, Coverdale S, McCloskey TC, Hoffman DC, Cassella JV (2000). Effects of the CRF1 receptor antagonist, CP 154,526, in the separation-induced vocalization anxiolytic test in rat pups. *Neuropharmacol* 39:1357-1367.
76. Kehne JH, McCloskey TC, Baron BM, Chi EM, Harrison BL, Whitten JP, Palfreyman MG (1991). NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation-induced ultrasonic vocalizations. *Eur J Pharmacol* 193:283-292.
77. Kennett GA, Wood MD, Bright F, Trail B, Riley G, Holland V, Avenell KY, Stean T, Upton N, Bromidge S, Forbes IT, Brown AM, Middlemiss DN, Blackburn TP (1997) SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacol* 36:609-620.
78. Kholodar-Smith DB, Allen TA, Brown TH (2008). Fear conditioning to discontinuous auditory cues requires perirhinal cortical function. *Behav Neurosci* 122:1178-1185.
79. Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2000) Involvement of corticotropin-releasing factor in the retrieval process of fear-conditioned ultrasonic vocalization in rats. *Physiol Behav* 71:323-328.
80. Kim EJ, Kim ES, Covey E, Kim JJ (2010). Social transmission of fear in rats: the role of 22-kHz ultrasonic distress vocalization. *PLoS One* 5:e15077.
81. Klein S, Nicolas LB, Lopez-Lopez C, Jacobson LH, McArthur SG, Grundschober C, Prinssen EP (2010). Examining face and construct validity of a noninvasive model of panic disorder in Lister-hooded rats. *Psychopharmacology (Berl)* 211:197-208.
82. Klodzinska A, Tatarczynska E, Chojnacka-Wojcik E, Nowak G, Cosford NDP, Pile A (2004). Anxiolytic-like effects of MTEP, a potent and selective mGlu₅ receptor agonist does not involve GABA_A signaling. *Neuropharmacology* 47:342-350.
83. Knapp DJ, Pohorecky LA (1995). An air-puff stimulus method for elicitation of ultrasonic vocalizations in rats. *J Neurosci Methods* 62:1-5.
84. Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J Comp Psychol* 112:65-73.
85. Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J (1999). High-Frequency Ultrasonic Vocalizations Index Conditioned Pharmacological Reward in Rats. *Physiol Behav* 66:639-643.
86. Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ (2006). Early life stress impairs fear conditioning in adult male and female rats. *Brain Res* 1087:142-150.

87. Kosten TA, Miserendino MJD, Bombace JC, Lee HJ, Kim JJ (2005) Sex-selective effects of neonatal isolation on fear conditioning and foot shock sensitivity. *Behav Brain Res* 157:235-244.
88. Krall CM, Andicochea CT, McDougall SA (2005). Ultrasonic vocalization production of preweanling rats: Effects of central and peripheral administration of +/-2-adrenoceptor agonists. *Eur J Pharmacol* 517:200-207.
89. Krupitsky EM, Burakov AM, Ivanov VB, Krandashova GF, Lapin IP, Ja Grinenko A, Borodkin YS (1993) Baclofen administration for the treatment of affective disorders in alcoholic patients. *Drug Alcohol Depend* 33:57-163.
90. Laviolette SR, Grace AA (2006). Cannabinoids Potentiate Emotional Learning Plasticity in Neurons of the Medial Prefrontal Cortex through Basolateral Amygdala Inputs. *J Neurosci* 26:6458-6468.
91. Lee H, Choi J, Brown T, Kim J (2001). Amygdalar nmda receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. *J Neurosci* 21:4116-4124.
92. Leman S, Dielenberg RA, Carrive P (2003) Effect of dorsal periaqueductal gray lesion on cardiovascular and behavioural responses to contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 143:169-176.
93. Lindquist D, Jarrard L, Brown TH (2004). Perirhinal cortex supports delay fear conditioning to rat ultrasonic social signals. *The Journal of Neuroscience* 24:3610-3617.
94. Litvin Y, Blanchard DC, Blanchard RJ (2007). Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behav Brain Res* 182:166-172.
95. Lopez JF, Liberzon I, Vázquez DM, Young EA, Watson SJ (1999). Serotonin 1A receptor messenger RNA regulation in the hippocampus after acute stress. *Biological Psychiatry* 45:934-937.
96. Lore R, Flannelly K, Farina P (1976). Ultrasounds produced by rats accompany decreases in intraspecific fighting. *Agress Behav* 2:175-181.
97. Maria TK (1991). Acoustic startle induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel animal model of anxiety? *Behav Brain Res* 43:133-137.
98. Marsicano G, Wojtak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di MarzoV, Beat L (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530-534.
99. Martino G, Perkins MN (2008). Tactile-induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel assay to assess anti-migraine therapies in vivo. *Cephalalgia* 28:723-733.
100. McDermott C, Kelly JP (2008). Comparison of the behavioural pharmacology of the Lister-Hooded with 2 commonly used albino rat strains. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1816-1823.

101. McGinnis MY, Vakulenko M (2003). Characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in male and female rats. *Physiol Behav* 80:81-88.
102. McGregor IS, Dastur FN, McLellan RA, Brown RE (1996). Cannabinoid modulation of rat pup ultrasonic vocalizations. *Eur J Pharmacol* 313:43-49.
103. Mead A, Li M, Kapur S (2008). Clozapine and olanzapine exhibit an intrinsic anxiolytic property in two conditioned fear paradigms: Contrast with haloperidol and chlordiazepoxide. *Pharmacol Biochem Behav* 90:551-562.
104. Molewijk HE, van der Poel AM, Mos J, van der Heyden JA, Olivier B (1995). Conditioned ultrasonic distress vocalizations in adult male rats as a behavioural paradigm for screening anti-panic drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 117:32-40.
105. Monleon S, Vinader-Caerols C, Arenas MC, Parra A (2008). Antidepressant drugs and memory: Insights from animal studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:235-248.
106. Morley KC, McGregor IS (2000) (\pm)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine MDMA, 'Ecstasy' increases social interaction in rats. *Eur J Pharmacol* 408, 41-49.
107. Mu P, Fuchs T, Saal DB, Sorg BA, Dong Y, Panksepp J (2009). Repeated cocaine exposure induces sensitization of ultrasonic vocalization in rats. *Neurosci Lett* 453:31-35.
108. Muraki I, Inoue T, Koyama T (2008). Effect of co-administration of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100,635 and selective 5-HT_{1B/1D} receptor antagonist GR 127,935 on anxiolytic effect of citalopram in conditioned fear stress in the rat. *Eur J Pharmacol* 586:171-178.
109. Naito H, Nakamura A, Inoue M, Suzuki Y (2003). Effect of anxiolytic drugs on air-puff-elicited ultrasonic vocalization in adult rats. *Exp Anim* 52:409-414.
110. Nazarian A, Krall CM, Osburn JR, McDougall SA (2001). Ultrasonic vocalizations of preweanling rats: involvement of both α -2-adrenoceptor and μ -opioid receptor systems. *Eur J Pharmacol* 415:165-171.
111. Neophytou SI, Graham M, Williams J, Aspley S, Marsden CA, Beckett SRG (2000). Strain differences to the effects of aversive frequency ultrasound on behaviour and brain topography of c-fos expression in the rat. *Brain Res* 854:158-164.
112. Nicolas LB, Klein S, Prinssen EP (2007). Defensive-like behaviors induced by ultrasound: further pharmacological characterization in Lister-hooded rats. *Psychopharmacology (Berl)* 194:243-252.
113. Nishikawa H, Inoue T, Izumi T, Koyama T (2007). Synergistic effects of tandospirone and selective serotonin reuptake inhibitors on the contextual conditioned fear stress response in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:643-650.
114. Nobre MJ, Brandao ML (2004) Analysis of freezing behavior and ultrasonic vocalization in response to foot-shocks, ultrasound signals and GABAergic inhibition in the inferior colliculus: effects of muscimol and midazolam. *Eur J Pharmacol* 14:45-52.

115. Nordquist RE, Durkin S, Jaeschke G, Spooren W (2007). Stress-induced hyperthermia: Effects of acute and repeated dosing of MPEP. *Eur J Pharmacol* 568:199-202.
116. Olivier B, Molewijk E, van Oorschot R, van der Heyden J, Ronken E, Mos J (1998a). Rat pup ultrasonic vocalization: effects of benzodiazepine receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 358:117-128.
117. Olivier B, Molewijk HE, van der Heyden JAM, van Oorschot R, Ronken E, Mos J, Miczek KA (1998b) Ultrasonic vocalizations in rat pups: effects of serotonergic ligands. *Neurosci Biobehav Rev* 23:215-227.
118. Olivier B, van Winjngaarden I, Soudijn W (2000) 5-HT₃ receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review. *Eur Neuropsychopharmacol* 10:77-95.
119. Pamplona FA, Takahashi RN (2006). WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB₁ cannabinoid receptors. *Neurosci Lett* 397:88-92.
120. Panksepp J (2007). Neuroevolutionary sources of laughter and social joy: Modeling primal human laughter in laboratory rats. *Behav Brain Res* 182:231-244.
121. Panksepp J, Burgdorf J (2000). 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behav Brain Res* 115:25-38.
122. Panksepp J, Burgdorf J (2003). "Laughing" rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol Behav* 79:533-547.
123. Pavon FJ, Bilbao A, Hernández-Folgado L, Cippitelli A, Jagerovic N, Abellán G (2006). Antiobesity effects of the novel in vivo neutral cannabinoid receptor antagonist 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1H-1,2,4-triazole-LH 21. *Neuropharmacol* 51:358-366
124. Pawlak D, Takada Y, Urano T, Takada A (2000). Serotonergic and kynurenic pathways in rats exposed to foot shock. *Brain Res Bull* 52:197-205.
125. Podhorna J, Brown RE (2000). Interactions between N-methyl-D-aspartate and nitric oxide in the modulation of ultrasonic vocalizations of infant rats. *Eur J Pharmacol* 408:265-271.
126. Porter RH, Jaeschke G, Spooren W, Ballard TM, Buttelmann B, Kolczewski S, Peters JU, Prinssen E, Wichmann J, Vieira E, Muhlemann A, Gatti S, Mutel V, Malherbe P (2005). Fenobam: a clinically validated nonbenzodiazepine anxiolytic is a potent, selective, and noncompetitive mGlu5 receptor antagonist with inverse agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther* 315:711-721.
127. Reuter LE, Wicke K, Basso AM, Jongen-Relo AL, Van Gaalen MM, Gross G, et al. (2006). Characterization of 5-HT_{5A} antagonists in models of depression and anxiety. 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 14–18, October 2006, Atlanta, USA, Abstract 33.3.

128. Roche M, O'Connor E, Diskin C, Finn DP (2007). The effect of CB₁ receptor antagonism in the right basolateral amygdala on conditioned fear and associated analgesia in rats. *Eur J Neurosci* 26:2643-2653.
129. Rodgers RJ, Haller J, Halász J., Mikics É (2003). 'One-trial sensitisation' to the anxiolytic-like effect of cannabinoid receptor antagonist SR141716A in the mouse elevated plus-maze. *Eur J Neurosci* 17:1279-1286
130. Sadananda M, Wöhr M, Schwarting RKW (2008). Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neurosci Lett* 435:17-23.
131. Sanchez C (1993) Effect of serotonergic drugs on footshock-induced ultrasonic vocalization in adult male rats. *Biochem Pharmacol* 4:269-277.
132. Sanchez C (2003a) R-citalopram attenuates anxiolytic effects of escitalopram in a rat ultrasonic vocalisation model. *Eur J Pharmacol* 464:155-158.
133. Sanchez C (2003b) Stress-induced vocalisation in adult animals. A valid model of anxiety? *Eur J Pharmacol* 463:133-143.
134. Sanchez C, Arnt J, Costall B, Domeney AM, Kelly E, Naylor RJ (1995). Sertindole: A limbic selective neuroleptic with potent anxiolytic effects. *Drug Devel Res* 34:19-29.
135. Sanchez C, Bergqvist PB, Brennum LT, Gupta S, Hogg S, Larsen A, Wiborg O (2003). Escitalopram, the S-(+)-enantiomer of citalopram, is a selective serotonin reuptake inhibitor with potent effects in animal models predictive of antidepressant and anxiolytic activities. *Psychopharmacology (Berl)* 167:353-362.
136. Sanchez C, Meier E (1997). Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. *Psychopharmacol* 129:195-205.
137. Sanchez C, Mork A (1999). N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline studies on the role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in mediating foot-shock-induced ultrasonic vocalisation in adult rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 9:287-294.
138. Schreiber R, Melon C, De Vry J (1998). The role of 5-HT receptor subtypes in the anxiolytic effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the rat ultrasonic vocalization test. *Psychopharmacology (Berl)* 135:383-391.
139. Schwarting RKW, Jegan N, Wöhr M (2007). Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 182:208-222.
140. Shephard RA, Wedlock P, Wilson NE (1992). Direct evidence for mediation of an anticonflict effect of baclofen by GABA_B receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 41:651-653.
141. Shepherd JK, Blanchard DC, Weiss SM, Rodgers RJ, Blanchard RJ (1992). Morphine attenuates antipredator ultrasonic vocalizations in mixed-sex rat colonies. *Pharmacol Biochem Behav* 41:551-558.

142. Shigemoto R, Mizuno N. Metabotropic glutamate receptors immunocytochemical and in situ hybridization analyses. In: Ottersen OP, Storm-Mathisen J, editors. *Handbook of chemical neuroanatomy, Glutamate*. Elsevier; 2000. Volume 18 p.63-98
143. Silva RCB, Brandpo ML (2000). Acute and Chronic Effects of Gepirone and Fluoxetine in Rats Tested in the Elevated Plus-maze: An Ethological Analysis. *Pharmacol Biochem Behav* 65:209-216.
144. Sink KS, Segovia KN, Collins LE, Markus EJ, Vemuri VK, Makriyannis A, Salamone JD (2010). The CB1 inverse agonist AM251, but not the CB1 antagonist AM4113, enhances retention of contextual fear conditioning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 95:479-484.
145. Stark H, Scheich H (1997). Dopaminergic and serotonergic neurotransmission systems are differentially involved in auditory cortex learning: a long-term microdialysis study of metabolites. *J Neurochem* 68:691-697.
146. Starr KR, Price GW, Watson JM, Atkinson PJ, Arban R, Melotto S, Dawson LA, Hagan JJ, Upton N, Duxon MS (2007). SB-649915-B, a novel 5-HT_{1A/B} autoreceptor antagonist and serotonin reuptake inhibitor, is anxiolytic and displays fast onset activity in the rat high light social interaction test. *Neuropsychopharmacol* 32:2163-2172.
147. Steckler T, Lavreysen H, Oliveira AM, Aerts N, Van Craenendonck H, Prickaerts J, Megens A, Lesage ASJ (2005a). Effects of mGlu1 receptor blockade on anxiety-related behaviour in the rat lick suppression test. *Psychopharmacology (Berl)* 179:198-206.
148. Steckler T, Oliveira AFM, Van Dyck C, Van Craenendonck H, Mateus AMA, Langlois X, Lesage ASJ, Prickaerts J (2005b). Metabotropic glutamate receptor 1 blockade impairs acquisition and retention in a spatial Water maze task. *Behav Brain Res* 164:52-60.
149. Takahashi LK (1992). Developmental expression of defensive responses during exposure to conspecific adults in preweanling rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 106:69-77.
150. Takahashi LK, Thomas DA, Barfield RJ (1983). Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by residents during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 97:207-212.
151. Tan H, Lauzon NM, Bishop SF, Bechard MA, Laviolette SR (2010). Integrated cannabinoid CB₁ receptor transmission within the amygdala-prefrontal cortical pathway modulates neuronal plasticity and emotional memory encoding. *Cereb Cortex* 20:1486-1496.

152. Thomas DR, Soffin EM, Roberts C, Kew JNC, de la Flor RM, Dawson LA, Fry VA, Coggon SA, Faedo S, Hayes PD, Corbett DF, Davies CH, Hagan JJ (2006). SB-699551-A (3-cyclopentyl-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-N-[(4'-{[(2-phenylethyl) amino] methyl} -4- biphenyl) methyl] propanamide dihydrochloride), a novel 5-HT_{5A} receptor-selective antagonist, enhances 5-HT neuronal function: Evidence for an autoreceptor role for the 5-HT_{5A} receptor in guinea pig brain. *Neuropharmacol* 51:566-577.
153. Thomas DA, Takahashi LK, Barfield RJ (1983). Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 97:201-206.
154. Tomazini FM, Reimer A, Albrechet-Souza L, Brandao ML (2006). Opposite effects of short- and long-duration isolation on ultrasonic vocalization, startle and prepulse inhibition in rats. *J Neurosci Methods* 153, 114-120.
155. van der Poel AM, Noach EJ, Noach EJ, Miczek KA (1989). Temporal patterning of ultrasonic distress calls in the adult rat: effects of morphine and benzodiazepines. *Psychopharmacology (Berl)* 97:147-148.
156. Varga B, Kassai F, Gyertyán I (2012) Interactions of CB1 and mGlu5 receptor antagonists in food intake, anxiety and memory models in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 103:425-430.
157. Vaswani M, Linda FK, Ramesh S (2003). Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:85-102. Ref ID: 353
158. Vivian JA, Miczek KA (1993). Morphine attenuates ultrasonic vocalization during agonistic encounters in adult male rats. *Psychopharmacol (Berl)* 111:367-375.
159. WHO (2013) Fact sheet N°311. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>
160. Winslow JT, Insel TR (1990). Serotonergic and catecholaminergic reuptake inhibitors have opposite effects on the ultrasonic isolation calls of rat pups. *Neuropsychopharmacol* 3:51-9.
161. Winslow JT, Insel TR (1991). Serotonergic modulation of the rat pup ultrasonic isolation call: studies with 5HT₁ and 5HT₂ subtype-selective agonists and antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 105:513-520.
162. Wöhr M, Borta A, Schwarting KWR (2005). Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: A dose-response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 84:228-240.
163. Wöhr M, Houx B, Schwarting RKW, Spruijt B (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiol Behav* 93:766-776.
164. Wöhr M, Kehl M, Borta A, Schänzer A, Schwarting RKW, Höglinger GU (2009). New insights into the relationship of neurogenesis and affect: tickling induces hippocampal cell proliferation in rats emitting appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neurosci* 163:1024-1030.

165. Wöhr M, Schwarting RK (2008). Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behav Neurosci* 122:310-330.
166. Wöhr M, Schwarting RK (2007). Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PLoS One* 2:e1365.
167. Zanettini CFP, Panlilio LV, Alicki M, Goldberg SR, Haller J, Yasar S (2011). Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci* 5:1-21.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Bárdos Györgynek a témavezetői munkájáért. Kiemelt köszönet illeti Dr. Gyertyán Istvánt, aki folyamatosan nyomon követte munkámat, és hasznos jó tanácsokkal látott el mind a kísérletes munka, mind a közlemények megírása során. Köszönettel tartozom továbbá Zsebők Sándornak az USV lejátsszó rendszer műszeres beállításában nyújtott önzetlen segítségéért. Végül, de nem utolsó sorban, szeretnék köszönetet mondani Adorjányiné Perjés Gabriellának a lelkes asszisztensi munkájáért.